日本水産学会誌

第二十三巻　第二号

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 23, No. 2 1957

p. 86

目　　次

魚の血液ガス含量と環境水の酸素分圧との関係(英文)……板沢　靖男…… 71
ニシン卵の受精の研究—IV　成熟卵の卵門附近に存在する精子賦活要因について…柳町　隆造…… 81
魚類網膜の錐体電位が最大になる為の最低の明るさ及びその生態的意義(英文)
……田村保・御手洗玄洋・杉田雄一郎…… 86
イカ筋肉の新収縮性蛋白—コイのアクトミオシンとの比較的研究(英文)……松本重一郎…… 92
Glycylglycine dipeptidase に対する金属イオンの影響—III
Glycylglycine dipeptidase の反応基に対する一考察……斗ケ沢宣久……105
Glycylglycine dipeptidase に対する金属イオンの影響—IV
SH 化合物と金属イオン殊に Co^{++} Mn^{++} Mg^{++} の関係に就いて……斗ケ沢宣久……109
魚類肝臓貯蔵時のビタミンAの減少に対する肝臓含有酵素の影響……清水千秋・福原忠信……115
ビタミンKの抗菌作用機構—IV　加水分解酵素に対するビタミンKの作用……北御門　学……120
綜　述
最近の水中懸濁物測定法に就いて……古川　厚……124
雑　録……138

昭和三十二年
日本水産学会
The Japanese Society of Scientific Fisheries
TOKYO

CONTENTS

Gas content of the blood in response to that of medium water in fish ……Yasuo ITAZAWA…… 71

*Studies of fertilization in *clupea pallasii*—IV Some properties of the sperm-stimulating factor in the micropyle area of the mature egg ……Ryuzo YANAGIMACHI…… 81

The lowest intensity of illumination to produce the maximum cone potential in the fish retina and its ecological meaning ……Tamotsu TAMURA, Genyo MITARAI and Yuichiro SUGITA…… 86

A new contractile protein of squid muscle—a comparative study with carp actomyosin ……Juichiro J. MATSUMOTO…… 92

*Effects of metal ions on the glycylglycine dipeptidase—III On the active group of the glycylglycine dipeptidase……Yoshihisa TOGASAWA……105

*Effects of metal ions on the glycylglycine dipeptidase—IV On the interaction between sulfhydryl compounds and metal ions especially Co^{++}, Mn^{++} and Mg^{++} ……Yoshihisa TOGASAWA……109

*Influence of the enzyme on the decrease of vitamin A in the fish liver during storage……Chiaki SHIMIZU and Tadanobu FUKUHARA……115

*Studies on the mechanism of antibiotic action of vitamin K—IV Effect of vitamin K on hydrolytic enzmes…… Manabu KITAMIKADO……120

Review

Recent advances in measurement of aquatic suspensoid……Atsushi FURUKAWA……124

* In Japanese with synopsis in English.

All communications and publications should be addressed to :
Japanese Society of Scientific Fisheries, c/o Tokyo University of Fisheries, Shiba kaigandori 6-chome, Tokyo, Japan.

お 願 い

本来前納制の会費ですが，会費の納入が思わしくありませんので，会の運営その他色々と支障が起つておりますので，御手数でもあり，また御都合もあることゝ思いますが，本年度分（32 年度）までの会費未納の方及び自費出版並びに超過頁，別刷印刷代金の未納の方は至急御納入下さい。

昭和 32 年 5 月 25 日

日 本 水 産 学 会 会 計 理 事

公　　告

日本水産学会昭和 32 年度秋期大会開催公告

日　時	昭和 32 年 10 月 9 日（水），10 日（木），11 日（金）	
場　所	函館市港町　北海道大学水産学部	
日　程	第 1 日（9 日）	9.00～12.00　研究発表
		12.00～13.00　評議員会
		13.00～17.00　研究発表
	第 2 日（11 日）	9.00～12.00　研究発表
		12.00～13.00　学会賞詮衡委員会
		13.00～17.00　研究発表
		18.00～21.30　懇親会
	第 3 日（11 日）	
	午前	シンポジウム 1. 水産動物肉エキス 2. 水産増殖 3. プランクトン研究連絡会
	午後	市中見学
懇親会	湯川．明月園	会費 400 円
見　学	市内見学	（トラピスト．函館山．その他水産工場施設）費用　100 円
宿　舎	（1 泊．2 食付）	A 1.200 円，B 800 円，C 500 円の予定． （定員の都合で等級別は御希望に副いかねるかも知れませんが，予め御諒承下さい。）

（裏面につづく）

……キ……リ……ト……リ……線……

参　加　申　込　書

（申込期限 8 月 31 日期限厳守）

氏　名

所属機関名

連絡先

演　題　　　　（氏名　　　　）

掛　図　　　　有　　無

スライド　　　　有　　無

宿　舎　　　日の朝，昼，夕食から　　　日の朝，昼，夕食まで

A．1200 円，B．800 円，C．500 円

懇親会　（会費 400 円）　　出　　欠

市内見学　（費用 100 円）　　参加　　不参加

シンポジウム　　出 1．2．3．　欠

参加及び講演申込み.

1. 大会参加希望者は申込書により8月 31 日までに申込んで下さい。〆切後の申込は受付けません。
2. 1名で講演し得る題数は2題以内とし，共同発表は演者に○印をつけて下さい。
3. 講演希望者は 200 字以内の講演要旨を8月 31 日までに必着するようお送り下さい。
4. 講演時間は 10 分以内とし，申込多数の際は発表時間を短縮する事があります。

水産学会秋期大会委員長　田　村　　保
〃　　準備委員長　谷　川　英　一

郵便はがき

切手

北海道函館局内港町一二五三
北大水産学部内
日本水産学会
秋期大会準備
委員会 行

通信欄

日本水産学会投稿規定

1. 報文の投稿者は本会員個人に限る。但し会員外の共同研究者を含むことは差支えない。
2. 報文は投稿者の原著で他の刊行物に未発表のものに限る。
3. 報文は総て本会に送付し，本会に到着した日を以つて，受付月日とし，受付けた原稿は総て編集長の指定する2名の編集理事が回覧し，掲載可と認めたものはそのまゝ受理する。この場合の受理月日は受付月日とする。編集理事が其のまゝ掲載することに疑義をいだいた場合は編集長にその旨報告する。この場合編集長は編集会議を招集，審議し，受理し得ないと認めた場合はその理由を附し，原著者に返却し，訂正を求める。この場合の受理月日は，学会が訂正原稿を受理した月日とする。受理した論文は，その受理月日の順に掲載する。但し，その報文又は報文抄録が印刷費著者負担の場合は，会誌を増頁して掲載する。抄録を希望する場合は本論文をそえて提出すること。
4. 原稿1篇の長さは原則として刷上り4頁（表題. 200語の英文抄録を除き，図表の占める紙面を含め約 7000 字相当）とする。原稿一篇の学会負担の基準印刷費（7.200円）を超過した場合は著者が負担する。
5. 会員が会費又は著者として負担すべき印刷費の支払いを怠るときは，支払いのあるまでその会員の報文の受理又は掲載を見合せることがある。
6. 邦文報告には原則として 200 語以内の英文抄録（題名と著者名とを附記，名前は省略せぬこと，）を添える。
7. 図表には英文の説明をつける。邦文を併用してもよい。
8. 投稿の細目については別に定める注意書きに従う。

投稿に関する注意

1. 原稿を投稿するときには，本会所定の投稿カード（請求により配付する）に必要事項を記入し，之を原稿に添え本会に提出する。
2. 初校は原則として，著者が校正する（校正は迅速に行う事）。尚文章又は図，表の変更や追加は禁ずる。再校以後は編集部で校正する。
3. 英文抄録，図及び表の表題，説明等の英訳を希望される向はその原案を添えて投稿されたい。但し実費を申し受ける。
4. 別刷りの料金（X円）は次の式によつて算出される通りとする。X=(1+P)(N−50) 円 P：頁数，N：別刷数（50 部を単位とする）従つて 50 部までは頁数に関らず無料である。特に表紙をつけることを希望される場合は，著者負担によつてこれをつける。(50 部当り 300 円)
5. 投稿後掲載までの間に著者の連絡先が変つたときには必ず通知されたい。

原稿の書き方

原稿は会誌体裁の統一，誤りの防止，編集印刷の便宜上次の諸規定を守られたい。既出報文との調和其の他のために例外を望まれる著者はその都度明記されたい。

1. 邦文原稿は本会所定の原稿用紙にペンで横書きにし，記述は簡単明瞭にし新かなづかいを用いて難かしい漢字はさける。英文抄録は本文とは別葉にする。
2. 欧文原稿は厚手の上質紙に2段送りのタイプで打つ。欧文本文以外の欧文個所はペン書きでもよいが必ず活字体を用いる。
3. 字体の指定は右の如く赤で入れる。

abcd (イタリ)	abcd (ゴシック)	Abcd (大)	ABCD (S.C.)	OOV	BA
Italic	**Gothic**	CAPITAL	CAP. & SMALL CAP.	うわつき（かたつき）	したつき

4. **表題** 主題・副題は別行に書き各々ピリオド（.）をつけない。第○報の場合はローマ数字（I, II）にして（——）でつなぎ数字の後に（.）をつける。
英文表題では第一語の他，名詞，副詞，形容詞，〔動詞は慣用に従う〕の頭文字は大文字にする。

5. **著者名** 邦文では連名の時は（・）で連ねる。ローマ字では名の頭を Capital 後は Small，姓の頭を Capital 後は Small Capital にする。連名の時は（,）で連ね最後の名の前を（and）で連ねる。（&）は用いない。末尾に（.）はつけない。

6. **所属** 著者名の下に（ ）で囲む。本文が邦文の時は英文の所属は入れない。但し著者が希望すれば脚註で入れてもよい。本文が英文の時は字体を *Italic* にする。

7. **図表** 表題，説明，内容とも英文で書く。必要ならば邦文併用もよい。番号は（Fig. 1. Table 1.）とする。番号，表題，説明は図ではその下に，表ではその上に入れる。表の細かい説明は下でもよい。邦文併用の時は邦文の番号（第1図，第1表）は省く。図表は必ず本文と別葉にし，本文中に挿入個所を赤で指定する。又本文中に引用する時は（Fig. 1，Table 1)を用いる。

8. **附図** 附図は1頁大の図版で（Plate）とし，なるべく篇末に入れる。原図が写真であつても本文中に組込む時は Fig. にする。附図の番号はローマ数字（I, II）を用いる。

9. **生物名** 邦文ではカタカナの和名の次に，学名を *Italic*（命名者名は Roman で頭文字を Capital, 後を Small Cap.）で入れ，英文では俗名の次に学名を邦文と同様に入れる。〔その間は（,）で切る〕これを原則とするが論文により必要がなければ一部又は全部の学名，俗名を略してもよい。学名は（ ）で囲まない事。

10. **化学名** 邦文中の外来語の化学名は一般的なものはカタカナを用い，英字を用いねばならない時は Small で入れる。

11. **人名** まぎれない時は姓のみを記し名と敬称とを省いてもよい。欧名でも姓のみで頭文字は後は Capital, 後は Small capital で書く。

12. **単位及び記号** 単位を表わす文字は英文中では（C.，cc.，m*l*.，kg.，m.）の如く（.）をつける。但し（Ω, μ, γ, N, M, pH, 及び方位の N, S, E, W）には（.）をつけない。邦文中ではこれらの（.）はすべて省く。量を代表する記号は（長さ *l*，高さ *h*）の如く *Italic* にする。

13. **邦文本文中の外国語**（横文字の場合）は人名，地名，ドイツ語の名詞等を除き Small で入れる。同一邦文中で同一物名の和洋語の混用はさける。

14. **文献** 本文中の関連個所にうわつきで一貫番号をつけ一括して末尾に集める。番号はアラビア数字（1,2,3）を用い片カッコ（1），パーレン）で囲み各行の末尾にピリオド（.）をつける。著者名は姓と名とを書き著者名の後はコロン（：）で切る。雑誌名の略し方は慣用法に従う。日本水産学会誌のことは本誌とする。英文雑誌名は *Italic* で書く。雑誌の巻番号は Gothic にする。西歴年号は必ず入れる。文献の見出しは（文献，References）とする。同一著者名，同一雑誌名を連記する時は（——）で略してもよい。
文献の書き方について著者の都合で上の指定によらない時は特にその事を付記しておく事。

15. **脚註** 脚註は数字でない記号（*, **）を用い関係頁の下段に入れ巻末に集めない。

Gas Content of the Blood in Response to That of Medium Water in Fish

Yasuo ITAZAWA
(Fisheries Institute, Faculty of Agriculture, Nagoya Univ., Japan)

Fish sometimes present symptoms of dyspnoea owing to the lack of dissolved oxygen in water, and at last become suffocated to death. In order to throw light upon such a phenomenon, it would be worth while to study not only the external conditions, *e.g.* the oxygen tension in the breathing water, but also the internal medium, the blood of fish.

We have already had a considerable number of works concerning the oxygen content of water in such cases as fish showing dyspnoea.

And many studies have been done upon the respiratory function of fish blood from the standpoint of the oxygen dissociation curve as well as the oxygen capacity. Nevertheless, the relation between the oxygen tension in the breathing water and the actual content of oxygen in fish blood, especially the arterial blood, has not yet been clearly known. KOKUBO (1935), in his excellent work on the acidosis of fish, investigated the response of the carbon dioxide content as well as pH value of the venous blood to the change of external condition in *Cyprinus* and *Leuciscus*. POWERS (1932) made a research with *Ictalurus* and *Cyprinus* on the relation between the amounts of oxygen and carbon dioxide in the blood taken from the heart and in breathing water. It seems, however, that the blood taken from the heart, which is venous, is not suitable enough for such a study as to investigate the relationship between the oxygen content of blood and that of water.

The present author took the arterial blood from the caudal artery and the venous blood from the caudal vein as well as the heart, and obtained some results on the relation between the actual content of gases in both the arterial and venous blood and the oxygen tension of the medium water.

It is a pleasure to record here a debt of gratitude to Professor Dr. I. AMEMIYA for his kindness in reading the manuscript.

And also the author wishes to acknowledge his indebtedness to Dr. T. TAMURA and Dr. N. KAWAMOTO for their kind suggestion.

Material and method

The fish employed in the study were carps, *Cyprinus carpio* LINNE', 13 males and 9 females, whose average size was 28.3 cm. in body length, and 558 g. in body weight.

Prior to bleeding, fish was operated on the caudal part. A small part (*ca.* 2 cm. × 3 cm.) of the muscle just posterior to the anal fin was removed on one side, and vertebrae were partially exposed. The arterial or venous blood was drawn into a calibrated syringe containing a small quantity of heparin solution——as small as only to wet the inside

Received Jan. 5, 1957

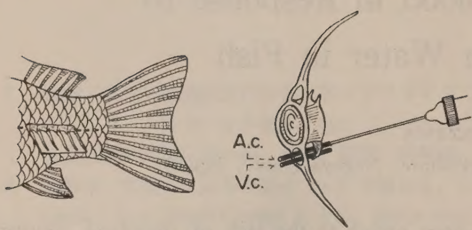


Fig. 1. The operation and the bleeding.
A.c. : Arteria caudalis, *V.c.* : Vena caudalis.

of the syringe——through a needle inserted in the artery (Arteria caudalis) or the vein (Vena caudalis) passing through the haemal canal of the exposed vertebrae (*cf.* Fig. 1.). The venous blood taken from the heart (Bulbus arteriosus) was also used for comparison. During the bleeding, the fish was kept under the surface of the breathing water. The blood taken was immediately transferred to the VAN SLYKE's manometric apparatus.

The operated fish was bled at varied intervals during the experiment. Such a practice should change the blood in quality as well as in quantity. But such repeated bleedings——0.6 cc. of blood was taken in each bleeding operation——seemed not to cause practically so ill effect unless the bleeding were repeated too many times. That matter was confirmed beforehand by preliminary experiments, one of which being shown in Table 1. In the

Table 1. The gas content of the arterial blood drawn from single fish repeatedly.
Fish : No. 27, ♂, 33 cm. in body length, and 768 g. in body weight.

Time hr. min.	Breathing water				Blood	
	Temp. (°C)	pH	O_2 content (cc. /*l.*)	O_2 tensien (mm. Hg)	O_2 content (vol. %)	CO_2 content (vol. %)
0.00	14.7	6.4	3.19	70.9	9.14	56.77
1.00	14.5	6.4	3.41	75.5	9.26	51.67
1.45	14.5	6.4	3.29	72.8	8.08	49.31
3.00	14.6	6.4	3.59	79.7	8.75	53.89
4.30	14.7	6.4	3.59	79.8	8.43	56.44
6.00	15.0	6.4	3.65	81.7	8.58	58.67

preliminary experiments the fish was kept in the circulating water to let them respire freely, and thus the oxygen tension of the water was kept approximately constant. The fish was bled six times at intervals of 45–90 minutes, and there was no appreciable difference among each of six values obtained for the oxygen content of the arterial blood. The carbon dioxide content showed some variation which, however, seem to have little definite meanings when considered from the results of the following experiments. An other preliminary experiment gave the similar result.

The content of oxygen and carbon dioxide of the blood was determined by employing the combined method of VAN SLYKE and NEILL (1924) referring VAN SLYKE (1927) and ZÖLLNER u. ZEILINGER (1954). The oxygen or the carbon dioxide content in this paper means the total oxygen or the total carbon dioxide content of the whole blood respectively. The volume of blood used for each determination was 0.5 cc. The dissolved oxygen content of the water was determined by the WINKLER's method, and the oxygen tension was calculated from it.

In some experiments fish respired in circulating water that had an approximately constant quantity of dissolved oxygen, and in other experiments fish was interned in still water in a tank and were forced to respire in limited volume of water. In the latter

cases, the oxygen tension of the breathing water decreased gradually through the course of the experiment, and the fish became to show symptoms of dyspnoea.

Comparison of the content of oxygen and carbon dioxide among the blood taken from various body parts.

Some examples of the content of oxygen and carbon dioxide of the blood that was taken from various parts of fish are shown in Table 2. Each fish examined was kept in the circulating water which showed almost equal tension of oxygen in each pair of successive bleedings.

Table 2. The comparison of gas content among the blood taken from various body parts.

Fish No.	Breathing water				Blood		
	Temp. (°C)	pH	O_2 content (cc. /*l*.)	O_2 tension (mm. Hg)	Source	O_2 content (vol. %)	CO_2 content (vol. %)
9	12.8	5.7	1.56	33.2	Artery	4.06	40.15
9	13.0	5.7	1.36	29.1	Vein	0.87	40.20
9	12.6	5.7	1.57	33.4	Artery	4.56	42.08
9	12.7	5.7	1.29	27.5	Vein	0.93	45.15
9′	12.6	6.4	3.39	72.0	Artery	5.36	31.60
9′	14.3	6.4	3.48	76.8	Vein	0.62	32.86
15′	14.7	6.5	3.77	83.8	Vein	0.91	14.02
15′	13.7	6.5	3.43	74.7	Heart	0.18	17.72
18′	13.3	6.4	3.84	82.8	Vein	1.37	20.32
18′	12.7	6.4	3.61	76.8	Heart	0.68	21.02

Artery : the caudal artery, Vein : the caudal Vein, Heart : Bulbus arteriosus.
Fish No. 9′, 15′ and 18′ were enfeebled when used.

As to the carbon dioxide content, there was no great difference between the arterial blood and the venous, though the latter showed a slightly higher value than the former. As to the oxygen content, on the contrary, the arterial blood was much different from the venous, although no essential difference could be observed between the venous blood taken from the caudal vein and that from the heart.

Experiment on the response of the blood gas content to the decrease of the oxygen tension of the breathing water.

In this experiment a fish operated ready to bleed was interned in the still water in a tank set in a thermostat chamber, therefore, the fish forced to respire in restricted volume (*ca*. 35 *l*.) of water. The oxygen tension of the water decreased gradually due to the respiration of the fish through the course of the experiment, although the surface of the water was exposed to the air. The water used for determination of the oxygen tension was collected from the middle layer of the receptacle (the depth of water was *ca*. 23 cm.), since the oxygen tension was nearly the same throughout all the depth even when the fish was near the surface.

The fish became to show symptoms of dyspnoea as time went on, and made often surfacing. The term "surfacing" was introduced by SHEPARD (1955) to denote the state of fish coming to the neck of the flask in which the fish was interned, and corresponds

to "hana-age" or "nose-lift" in Japanese. The fish was suffocated to death after a while unless it was transferred to the normal medium. Some examples of the experiments are given below.

Experiment 1. (Fig. 2-Exp. 1. and Table 3.-Exp. 1.)

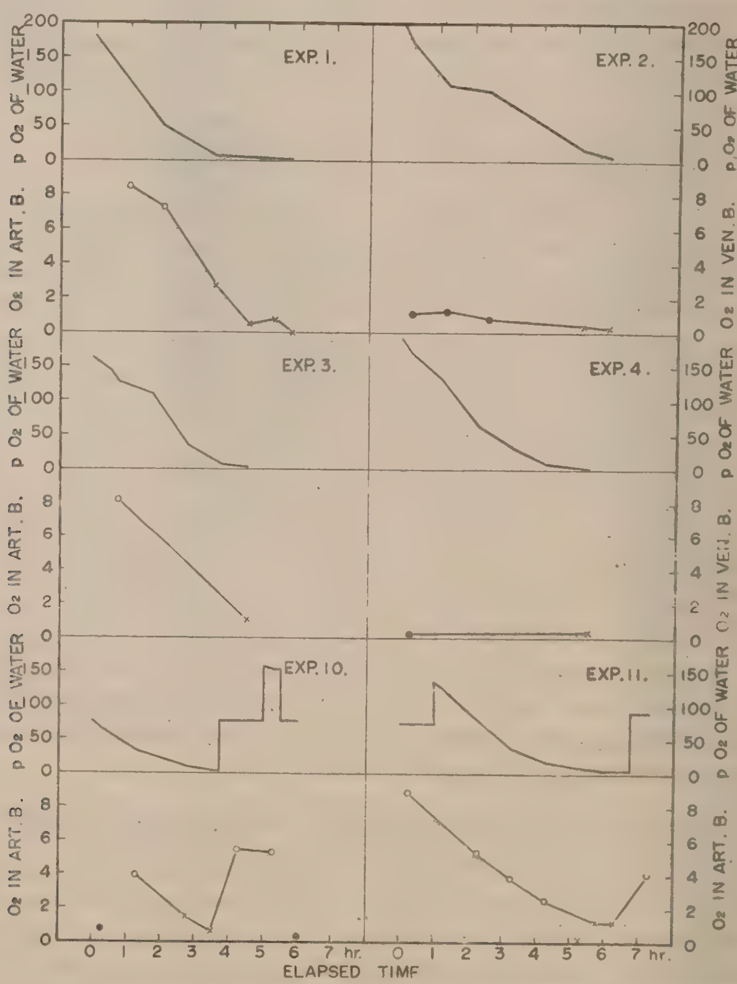


Fig. 2. The experiments on the response of blood gas content to the decrease of oxygen tension of the breathing water.

The upper curve in each experiment shows the oxygen tension (mm. Hg.) of the breathing water, and the lower one shows the oxygen content (vol. %) of blood. ○ in the lower curve in each experiment means the oxygen content of the arterial blood, ● that of the venous blood, and × that of either arterial or venous blood bled from the fish suffering from surfacing.

In this experiment the water was not renewed throughout the experiment. Temperature of the water was kept constant at 20°C.. The blood sample was obtained from the caudal artery only.

In the early stage of the experiment, the oxygen content of the arterial blood diminished

slowly, while the oxygen tension of the water decreased rapidly. As time went on, the water became almost devoid of dissolved oxygen, and the fish became to show surfacing. The arterial blood from a fish in such a state showed a low value in the oxygen content and in the carbon dioxide content as well. The respiratory frequency sank when the fish suffered from serious dyspnoea. The fish survived more than two hours in such a state and died eventually.

Experiment 2. (Fig2.-Exp.2. and Table 3.-Exp.2.)

The arrangement of experiment was similar to the Experiment 1. except the source of blood sample. The blood was obtained from the caudal vein only.

The oxygen tension of the water was high in the early stage of the experiment, and then decreased as time went on. Similarly as in the case of the Experiment 1.. But the oxygen content of the venous blood was low from the beginning. The response of the oxygen value of the venous blood to the change of the oxygen tension of the water was not clear, although a slow decline of that value was observed. The carbon dioxide content of the blood decreased according to the decline of the oxygen tension of the water.

Experiment 3. (Fig.2.-Exp.3. and Table 3.-Exp.3)

In this experiment the fish was bled only two times, namely at the beginning and at the end of the experiment, in order to avoid the effect of the repeated bleedings. Both two blood samples were obtained from the caudal artery. The result obtained was similar to that of Experiment 1..

Experiment 4. (Fig.2.-Exp.4. and Table 3.-Exp.4.)

The fish was bled only two times in this experiment, also The venous blood was used, and the similar result as that of Experiment 2. was obtained.

Experiment 10. (Fig.2.-Exp.10. and Table 3.-Exp.10)

In this experiment, the water was not renewed until three hours and three quarters elapsed, then the fish was transferred into running water (the oxygen tension was *ca.* 80 mm.Hg). The fish was again transferred into another water (the oxygen tension was *ca.* 150 mm.Hg) after an hour and a quarter from the first transference, and then was returned into the running water (*cf.* Fig. 2. and Table 3.). The blood samples were obtained principally from the caudal artery, and sometimes from the caudal vein for comparison.

The oxygen tension of the water decreased as time went on until the water was renewed. The content of both oxygen and carbon dioxide of the arterial blood diminished according to the decline of the oxygen tension of the water. And then fish became to develop surfacing. The surfacing, however, could not be seen as soon as the fish was transferred into running water, and the oxygen content of the arterial blood was recovered in a short duration of time. The value did not rise beyond some extent when the fish was trasferred anew into another water containing moe dissolved oxygen. The carbon dioxide content of the blood kept the declining for some time, but it recovered in some degree after less than two hours.

Experiment 11. (Fig.2.-Exp.11. and Table 3.-Exp.11.)

An outline of the experiment was similar to Experiment 10.. The fish respired in running water (the oxygen tension was *ca.* 80 mm.Hg) at the beginning, and then was

transferred into still water in a tank, and after then was put back again into the running water (*cf.* Fig. 2. and Table 3.).

The result was more or less similar to that of Experiment 10.. The oxygen content of the arterial blood diminished according to the decline of the oxygen tension in water, and was recovered in a short time after the transference into the running water. The carbon dioxide content of the blood was hardly recovered at that time, but rose again over the initial level after 24 hours.

Relation of gas content in blood to the oxygen tension of the breathing water.

The relation of the actual content of oxygen in both the arterial and venous blood to various tensions of oxygen of the medium water was summarized in Fig. 3.. This figure was drawn from the data based on such experiments as described in the preceding paragraph and some other complemental experiments.

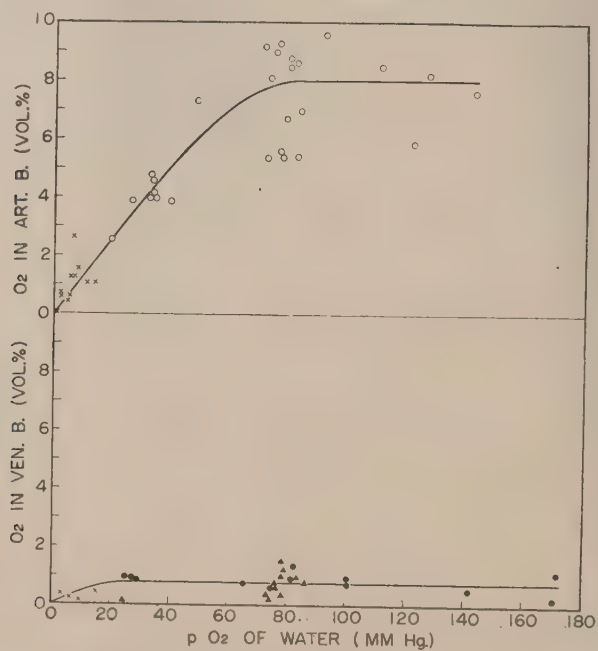


Fig. 3. The relation of the oxygen content of blood to the oxygen tension of the breathing water.

The upper curve was drawn from the data in the arterial blood, and the lower one from the data in the venous blood. Symbols, ○, ● and ×, are the same as in Fig. 2, while ▲ shows the oxygen content of the venous blood taken from the heart.

The oxygen content of the arterial blood increased with an increase in the oxygen tension of the water, and the value came up to the constant when the oxygen tension of the water reached at about 80 mm. Hg. The values lay in the range from 0 to 9.54 vol. %.

On the contrary, the oxygen content of the venous blood did not show no such clear

relation to the oxygen tension of the water as that the arterial blood, and the value arrived at the constant when the oxygen tension of the water was about 30 mm. Hg. The values were settled within 0.16—1.37 vol.%.

As to the carbon dioxide content, there was no great difference between the arterial and venous blood, as has been previously described. The values lay in the range from 1.89 to 58.67 vol.%, and the relation of the value to the oxygen tension of the water is generally not clearly perceivable. But roughly speaking, the blood taken from the fish which was suffering from surfacing state showed a lower value than that from normal fish.

Discussion and conclusion

It is generally thought that the determination of the actual content of the gas existing in the arterial blood of fish is difficult. It seems to the author that the difficulty of collecting the arterial blood is mainly accountable for it. WASTL (1928) cut off the tail of the carp and took the arterial blood from the caudal artery, but that method requires a large fish as a material, and the fish can be employed only once. The present author could easily obtain the arterial blood from the caudal artery through a simple operation as afore said. A fish was successfully bled several times without such ill effect as to interfere with the conclusion of the present study. It was confirmed by two curves in Fig. 3, showing the distinct divergence, that the separate taking of the arterial and venous blood was possible with little difficulty.

The actual content of the oxygen of the arterial blood varied from 0 to 9.54 vol.% according to the change of the oxygen tension of the breathing water in the carp. WASTL (1928) reported that the actual content of oxygen of the arterial blood was 9.51 vol.% on the average in the fish. The oxygen capacity of the blood of the fish was determined as 4.82 -15.93 vol.% (the average value : 11.28 vol.%) by WASTL (1928), and as 6.4—22.9 vol.% (the average value : 12.5 vol.%) by BLACK (1940). The actual content of oxygen of the arterial blood obtained by the present author in such cases as the breatning water were rich in the dissolved oxygen well coincided with the above value reported by WASTL (1928), and showed a fairly high degree of saturation against the oxygen capacities described by WASTL (1928) and BLACK (1940).

In the early stage of Experiment 1., the oxygen content of the arterial blood diminished slowly while the oxygen tension of the water decreased rapidly. And in Experiment 10, the oxygen content of the arterial blood did not rise beyond some extent when the fish was transferred into the water containing more dissolved oxygen. These results may be explained according to a sigmoidshape of the oxygen dissociation curve.

The arterial blood bled from such a fish respiring in the water deficient of dissolved oxygen showed low value of the carbon dioxide content as well as the oxygen content. KOKUBO (1930) showed that the decrease of the carbon dioxide content of the venous blood was caused by the oxygen decrease of the breathing water in *Cyprinus* and *Leuciscus*. POWERS (1932) reported that the carbon dioxide content of the venous blood of *Ictalurus* and *Cyprinus* increased with an increase of the oxygen tension in the water and *vice versa*. The result obtained by the present author roughly agreed with their conclusions. But in

the early stage of Experiment 11. the carbon dioxide content of the blood increased to the contrary of the decline in the oxygen tension of the breathing water.

The relation of the oxygen content in the arterial and venous blood to various oxygen tension of the breathing water was summarized in Fig. 3.. The figure of the arterial blood was more or less similar to the oxygen dissociation curve of the blood although the values were scattered to some extent probably due to varied data obtained by the water that had various tensions of carbon dioxide. On the contrary, the oxygen content of the venous blood did not show so clear relation to the oxygen tension of the water as that of the arterial blood. POWERS (1932) reported that the oxygen content of the venous blood of *Ictalurus* and *Cyprinus* increased with an increase of the oxygen tension in the water and *vice versa*. But the relationship was not so clear as that shown for the arterial blood in the present study. It seems that he could have obtained more precise relationship if the arterial blood had been used.

In the experiments forcing fish to live and to respire in limited volume of water, the fish came to develop surfacing as time went on. The arterial blood bled from such a fish as suffering from surfacing showed a lower oxygen content. This condition is anoxic anoxia, strictly speaking hypoxic hypoxia. Such cases are shown in the symbol (×) in Fig. 3. It seems that carp may develop surfacing when the oxygen content of the arterial blood is less than 2 vol.%, and may be sound when the value is more than 3 vol.% as presumed by Fig. 3. The value of oxygen tension of the water when the oxygen content of the arterial blood diminshes less than 2 vol.% should be affected by the carbon dioxide tension of the water (BOHR's effect), and the value was about 15 mm. Hg. in the experiments stated in the foregoing paragraph.

Summary

1) The content of oxygen and carbon dioxide of both the arterial and venous blood of the carp were determined. (Fig. 1.)

2) The figure showing the relation of the oxygen content of the arterial blood to various tensions of oxygen of the breathing water is similar to the oxygen dissociation curve of the blood. On the contrary, the oxygen content of the venous blood is generally low, and does not show clear relation to the oxygen tension of the breathing water. (Fig. 3.)

3) The carbon dioxide content showed no much difference between the arterial blood and the venous.

4) The arterial blood bled from such a fish as suffering from surfacing condition (*i.e.* symptoms of dyspnoea) showed a very low oxygen content. The carbon dioxide content also diminished in such a case. Carp may develop surfacing when the oxygen content of the arterial blood is less than 2 vol.%, and may be sound when the value is more than 3 vol.%. (Fig. 2.)

Table 3. The experiments on the response of the blood gas content to the decrease of oxygen tension of the breathing water

	Elapsed time hr. min.	Breathing water				Blood			Resp. freq. per min.	Behaviour of fish
		Temp. (°C)	pH	O_2 (cc. /l.)	O_2 (mm. Hg)	Source	O_2 (vol. %)	CO_2 (vol. %)		
Exp. 1.–Fish No. 13.	0.00	20.0	7.5	7.25	179.5	—	—	—	—	Normal
	1.00	20.0	7.0	4.46	110.5	Artery	8.44	34.29	—	Normal
	2.00	20.1	6.9	1.94	48.2	Artery	7.28	38.35	—	Normal
	3.30	20.0	6.7	0.27	6.7	Artery	2.68	33.53	92	Surfacing
	4.30	20.0	6.6	0.20	4.9	Artery	0.48	29.84	67	Surfacing
	5.15	20.0	6.6	0.09	2.2	Artery	0.74	14.04	41	Surfacing
	5.45	20.0	6.6	0.06	1.4	Artery	0	20.29	—	Mortal
Exp. 2.–Fish No. 14.	0.00	20.0	7.7	8.13	201.3	—	—	—	60	Normal
	0.15	20.0	7.5	6.94	171.7	Vein	1.11	24.32	60	Normal
	1.15	20.1	7.2	4.49	111.3	Vein	1.25	21.14	60	Normal
	2.30	20.2	7.0	4.06	100.8	Vein	0.80	—	70	Normal
	5.15	20.2	6.7	0.62	15.4	Vein	0.44	16.60	80	Surfacing
	6.00	20.2	6.6	0.27	6.7	Vein	0.24	10.88	—	Syncope
Exp. 3.–Fish No. 15.	0.00	20.8	7.5	6.44	162.0	—	—	—	—	Normal
	0.30	21.2	7.3	5.69	144.2	—	—	—	60	Normal
	0.45	22.2	7.2	4.90	126.4	Artery	8.19	20.69	92	Normal
	1.45	22.8	6.9	4.20	109.6	—	—	—	80	Normal
	2.45	22.9	6.9	1.13	35.3	—	—	—	109	Normal
	3.45	22.8	6.8	0.24	6.2	—	—	—	100	Surfacing
	4.15	22.9	6.7	0.13	4.1	—	—	—	71	Surfacing
	4.30	22.8	6.7	0.06	1.6	Artery	1.05	11.76	44	Surfacing
Exp. 4.–Fish No. 16.	0.00	22.3	8.1	7.43	192.1	—	—	—	—	Normal
	0.15	22.4	8.0	6.60	170.9	Vein	0.24	23.89	92	Normal
	1.15	22.8	7.3	4.86	126.7	—	—	—	100	Normal
	2.15	22.7	7.0	2.46	64.1	—	—	—	89	Normal
	3.15	22.7	6.9	1.28	33.2	—	—	—	109	Normal
	4.15	22.7	6.8	0.36	9.4	—	—	—	92	Surfacing
	4.45	22.8	6.8	0.22	5.7	—	—	—	80	Surfacing
	5.15	22.8	6.8	0.13	3.3	—	—	—	71	Surfacing
	5.30	22.8	6.8	0.13	3.3	Vein	0.39	10.53	44	Surfacing
Exp. 10.–Fish No. 22.	0.00	19.6	7.1	3.16	77.6	—	—	—	—	Normal
	0.15	19.7	7.1	2.66	65.5	Vein	0.75	12.58	—	Normal
	1.15	19.8	6.9	1.36	33.5	Artery	3.98	12.43	—	Normal
	2.45	19.9	6.8	0.33	8.1	Artery	1.55	9.05	67	Surfacing
	3.30	20.0	6.7	0.11	2.7	Artery	0.61	7.05	—	Surfacing
	3.45	—	—	—	—	—	—	—	—	Transference
	4.15	14.2	6.4	3.50	77.0	Artery	5.44	5.73	—	Normal
	5.00	12.8	6.9	7.34	156.6	—	—	—	—	Transference
	5.15	13.0	6.9	7.22	154.7	Artery	5.38	1.89	—	Normal
	5.30	—	—	—	—	—	—	—	—	Transference
	6.00	14.2	6.4	3.59	79.0	Vein	0.37	9.24	—	Normal
Exp. 11.–Fish No. 24.	0.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.30	12.9	6.4	3.48	74.4	Artery	8.95	19.21	73	Normal
	1.00	20.0	6.9	5.56	137.7	—	—	—	—	Transference
	1.15	20.0	6.8	5.15	127.5	—	—	—	—	Normal
	2.15	20.0	6.5	3.32	82.2	Artery	5.39	24.70	96	Normal
	3.15	20.0	6.4	1.60	39.6	Artery	3.86	30.15	96	Normal
	4.15	20.0	6.4	0.80	19.9	Artery	2.55	26.89	92	Normal
	5.15	20.0	6.3	0.41	10.2	Vein	0.16	20.11	77	Surfacing
	5.45	20.0	6.3	0.29	7.2	Artery	1.28	12.99	69	Surfacing
	6.15	20.0	6.3	0.25	6.2	Artery	1.27	7.94	60	Surfacing
	6.45	—	—	—	—	—	—	—	—	Transference
	7.15	15.7	6.4	4.00	90.8	Artery	4.13	8.54	67	Normal

Table 4. The measurement of the fish

Exp. No.	Fish No.	Sex	Body length (cm.)	Body weigt (g.)
1	13	♀	29	607
2	14	♂	29	582
3	15	♀	31	601
4	16	♂	29	604
10	22	♂	28	484
11	24	♂	27	450
—	9′	♀	31	785
—	15′	♀	31	601
—	18′	♀	30	588

References

Blace, E. C. (1940) : "The transport of oxygen by the blood of freshwater fish.", *Biol. Bull.*, **79**. 215—229.

Kokubo, Seiji (1930) : "Contribution to the research on the respiration of fishes—Ⅱ. Studies on the acidosis of fishes.", *Sci. Rept. Tohoku Imp. Univ.*, Ser. 4, **5**, 249—390.

Powers, E. B. *et al* (1932) : "The relation of respiration of fishes to environment.", *Ecol. Monog.*, 2, 385—473.

Shepard, M. P. (1955) : "Resistance and tolerance of young speckled trout (*Salvelinus fontinalis*) to oxygen lack, with special reference to low oxygen acclimation.", *J. Fish. Res. B. Canada*, **12**, 387—446.

Van Slyke, D. D. (1927) : "Note on a portable form of the manometric gas apparatus, and on certain points in the technique of its use.", *J. Biol. Chem.*, **73**, 121—126.

Van Slyke, D. D. and J. M. Neill (1924) : "The determination of gases in blood and other solutions by vacuum extraction manometric measurement—Ⅰ.", *J. Biol. Chem.*, **61**, 523—573.

Wastl Helene (1928) : "Beobachtungen" uber die Blutgase des Karpfenblutes.", *Bioch. Z.*, **197**, 363—380.

Zöllner, Nepomuk u. Elisabeth Zeilinger (1954) : "Über eine Verbesserung der Van Slyke schen Apparatur zur manometrischen Bestimmung der Blutgase.", *Naturwissenschaften*, **18**, 423.

ニシン卵の受精の研究—IV.
成熟卵の卵門附近に存在する精子賦活要因について

柳 町 隆 造
(北海道大学理学部動物学教室)

Studies of Fertilization in *Clupea pallasii*—IV.
Some Properties of the Sperm-Stimulating Factor in the Micropyle Area of the Mature Egg

Ryuzo YANAGIMACHI*

The spermatozoa of the herring (*Clupea pallasii*), unlike those of most species of marine fishes, are almost motionless even after they are set free into sea water or into Ringer's solution. However, if these quiescent spermatozoa are brought to the micropyle area of the mature egg of homologous species, they begin to move actively.

Micrurgical studies have revealed that the factor responsible for sperm activation is present on the surface of the egg-membrane around the micropyle (cf. Figs. 1 and 2). This sperm-stimulating factor is not removed from the egg-membrane even by rather violent washings with Ringer's solution. This fact seems to suggest that the factor in question is intimately bound on the surface of the egg-membrane.

The sperm-stimulating factor is readily removed (or inactivated) by treatment with some reagents, such as $CaCl_2$ solution, $MgCl_2$ solution, weakly acidified Ringer's solution, trypsin Ringer's solution, and heated Ringer's solution (cf. Tables 1 and 2).

When the sperm-stimulating factor is completely removed or inactivated by the action of the above-mentioned reagents, the egg becomes incapable of normal fertilization even if the egg proper is intact. Thus, the factor in question seems to be of special importance in the fertilization of the *Clupea* egg.

緒 言

ニシンの精子は他の多くの海産硬骨魚の精子と違つて，海水やリンゲル液の中で殆んど運動しないが[1]，成熟卵の卵門附近で非常に活潑な運動を始めるようになる[2]。このことはニシン卵の卵門附近に精子を活潑に（賦活）する或る特殊な要因が存在することを示している。

現在の処，この要因を物質として分離することには成功していないが，その二・三の性質を知ることができたので，玆に報告する。

材 料

材料は北海道西海岸の留萠及び増毛で捕獲したニシン *Clupea pallasii* CUVIER et VALENCIENNES の完熟した卵と精子であり，前回[1)2)3)]と同じ方法で親の個体から分離した。実験はすべて90％以上の受精率を示す卵を用いて行つた。実験に使用したリンゲル液の組成は M/4.5 NaCl 100部＋M/4.5 KCl 3.5部＋M/6.7 $CaCl_2$ 1.5部＋M/6.7 $MgCl_2$ 2.4部で，その pH は 7.6（$NaHCO_3$ で調整）であつた。媒精はすべてこの溶液中で行つた。実験温度は 5°〜13°C。

1957年3月26日受理

* Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo.

結　　果

精子を賦活するものは卵の何処に存在するか：緒論で述べたように，ニシンの精子は成熟卵の卵門附近で非常に活潑になるが，精子を賦活するものは卵膜中にあるのであろうか。それとも卵原形質中にあつてこゝから卵門を通つて分泌されているのであろうか。このことを明らかにするため，新鮮な未受精卵の卵体（卵原形質）と卵膜とを注意深く分離し*，これらに精子をかけてみた（リンゲル液中で）。その結果，精子が活潑になるのは卵門附近の卵膜の表面だけであることが解つた。卵原形質の表面や内容物には，全く精子を賦活する作用がなかつた（Fig. 1 及び 2 参照）。このことは精子を賦活するものが卵原形質中にはなく，卵門附近の卵膜にだけあることを示している。

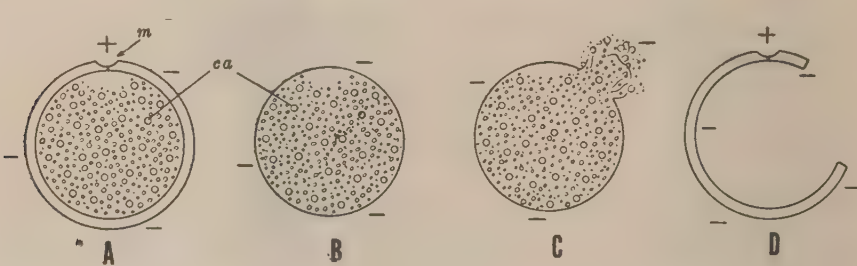


Fig. 1. Diagram to show the sperm activation at various regions of the egg. Symbols + and − denote intense sperm activation and no sperm activation respectively. **A**, intact egg; **B**, egg denuded of its membrane; **C**, denuded egg, the cortex of which is partly reptured (note that the materials which flowed out of the egg possess no capacity of activating the spermatozoa); **D**, empty egg-membrane; **ca**, cortical alveoli; **m**, micropyle.

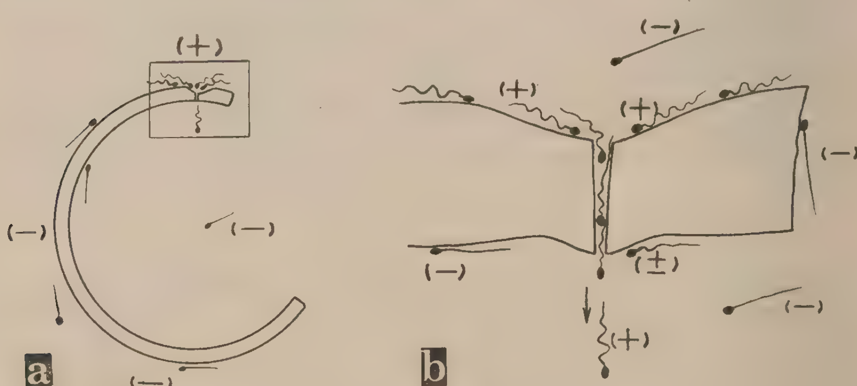


Fig. 2. Diagrammatic figure showing the sperm activation on the surface of the egg-membrane. Symbols +, ±, and − denote intense, faint, and no sperm activation respectively. **b** is the magnification of the micropyle area of **a**.

次に，この精子を賦活するものが洗滌のような操作によつて除去されるかどうかを知るため，卵膜（新鮮な未受精卵から分離したもの）にリンゲル液を激しく吹きつけてみた**。その結果，1 時間に亘り吹きつけをくり返しても卵門附近は依然として強い精子賦活作用をもつていた。このことは，精子を賦活するものが

* 卵をリンゲル液に浸してから眼科用の鋏（weckel 鋏）を使つて卵膜の一部を除去し，卵を静かに圧迫して卵膜の裂け目から外に押しだした。この際，卵表層に傷がつかないように留意した。

** 口径 1 mm のピペットを使用。

卵膜と強固に結合していることを示唆しているように思われる。

精子賦活要因に及ぼす種々の溶液の作用： 卵門附近の卵膜中にあつて精子を賦活するもの（以下，**精子賦活要因**と呼ぶ）は，上に述べたようにリンゲル液を吹きつけたくらいでは除去されないが，ある溶液によつては比較的簡単に除去或は不活性化されることが解つた。例えば，卵膜を等調の $CaCl_2$ 溶液に2時間或はそれ以上浸してからリンゲル液に入れ，加精してみると，卵門の処では1個の精子も活潑にならない。勿論卵門附近以外の卵膜上では精子は活潑にならない。この場合，卵膜自身には殆んど何の形態的変化も起つていないから，精子賦活要因だけが除去或は不活性化されていると考えられる。等調 $MgCl_2$ 液で2時間卵膜を処理した場合にも同じことが起る。

Table 1 及び2は精子賦活要因を完全に除去或は不活性化するに要する時間を，いろいろな溶液につき調べたものである。この表が示すように，精子賦活要因は $CaCl_2$ や $MgCl_2$ の外に，酸，トリプシン，高温などで簡単に除去或は不活性化される。

Table 1. Effect of various solutions on the removal (or inactivation) of the sperm-stimulating factor—I.

at 9°—12°C.

Solution*	Time required for complete removal (or inactivation) of sperm-stimulating factor (in hours)
M/4.5 NaCl (isotonic)	100<
M/4.5 KCl (〃)	100<
M/6.7 $CaCl_2$ (〃)	2
M/6.7 $MgCl_2$ (〃)	2
M/2 Sucrose (nearly isotonic)	12
Distilled water	24

* pH of the solutions was adjusted to 7.6 with $NaHCO_3$.

The membranes which were isolated from fresh unfertilized eggs were exposed to test solution for various periods of time. Then, they were transferred to Ringer's solution, washed thoroughly, and inseminated in it. When no spermatozoon was activated on the surface of the egg-membrane, the sperm-stimulating factor was considered to be completely removed or inactivated.

Table 2. Effect of various solutions on the removal (or inactivation) of the sperm-stimulating factor—II.

at 9°—12°C.

Solution	PH of solution was adjusted with	Time required for complete removal (or inactivation) of sperm-stimulating factor (in hours)
Isotonic Ringer* (pH 3.5)	HCl or CH_3COOH	1/4
Isotonic Ringer* (pH 7.6)	$NaHCO_3$	24
Isotonic Ringer* (pH 11.0)	NaOH or NH_4OH	2<
0.5% trypsin Ringer** (pH 7.6)	$NaHCO_3$	1/4
Isotonic Ringer* heated to 60°C.	$NaHCO_3$	1/2
Isotonic Ringer* heated to 70°C (pH 7.6—8.2)	〃	1/4
Natural sea water (pH 8.2)		5

* Constitution : M/4.5 NaCl 100 parts + M/4.5 KCl 3.5 parts + M/6.7 $CaCl_2$ 1.5 parts + M/6.7 $MgCl_2$ 2.4 parts.

** This solution was prepared by dissolving 0.5 g. of Merck's crude trypsin in 100 ml. of isotonic Ringer's solution.

精子賦活要因の役割： 新鮮な未受精卵を等調 $CaCl_2$ 液（pH 7.6）で 2時間処理してからリンゲル液に移して媒精すると，たとえどんな濃い精子をかけても卵は全く受精されない。これは卵門附近の精子賦活要因が除去或は不活性化されているために精子が全然賦活されず，従つて 1 個の精子も卵門に入らないためである。卵門が閉鎖したり，卵原形質が傷害を受けたためではない。卵原形質が傷害を受けていないことは，卵が人工刺戟（例えば硝子針による刺傷）に正常に反応し，表層胞の崩壊一極体放出一胚盤の形成などの一連の変化を起すことからでも明らかである。

未受精卵を等調 $MgCl_2$（pH 7.6）で 2時間，酸性リンゲル液（pH 3.5）で 15 分，0.5 %トリプシン・リンゲル液（pH 7.6）で 15 分処理した場合にも卵は受精不能になるが，この原因も $CaCl_2$ 処理の場合と同じく，精子賦活要因の除去或は不活性化であつて，卵門の閉鎖や卵原形質の傷害ではない。

このように，卵自体がたとえ何の障害を受けていなくても，精子賦活要因が除去或は不活性化されていると卵は受精できないから，精子賦活要因はニシンの受精にとつて極めて重要であると結論することができる。

論　　議

ウニなど或種の海産無脊椎動物の卵は，魚の卵と違つて卵膜の外側に粘稠なゼリー状物質をもつており，その中には同種の精子を活潑にし，又膠着させる物質が含まれている[4)5)6)7)]。この物質は LILLIE[4)] によつて初めて受精素（fertilizin）と名付けられた。LILLIE によると，この物質はウニ卵の受精に不可欠であり，もし洗滌などの操作によつて除去されると，卵の受精力は減退或は消失すると言う[8)9)]。彼は受精素とゼリー物質とは別のものであり，前者は成熟卵の内部からのみ分泌されると言う。ゼリーは単に受精素を吸い込んでいるに過ぎぬと考えられている。しかし最近は一般に，受精素とゼリー物質は同一のものであると考えられるようになつた。

ゼリー物質が卵細胞自身から分泌されるか，それとも濾胞細胞によつて分泌されたものかに就ては異論があるが，VASSEUR[6)] はいろいろなデーターを上げて，濾胞細胞から分泌されたものだと述べている。ゼリー物質の化学的性質は多くの人々[10)11)12)]により研究され，分子量 30 万くらいの糖蛋白(Mucopolysaccharide) がその主成分であることが明らかにされているが，ゼリー物質中の何が精子を活潑にするかに就てはまだ定説がない。

ニシン卵の周りにはウニ卵に於けるようなゼリー状の物質はないけれども，精子が卵門附近の卵膜上で非常に活潑になることから考えると，こゝには目には見えないが，ゼリー物質に相当するようなものがあるように思われる。現在の処このものだけを分離して化学分析するようなことに成功していないので，どのような物理化学的性質をもつているか明らかでないが，Table 1 及び 2 に示すように，$CaCl_2$，$MgCl_2$，酸，トリプシン，高温などに弱いことから考えると，蛋白質性のもの，或は蛋白質と結合したものでないかと想像される。

比較的最近，甲子・小川[13)]は生化学的方法でニシン卵から精子を活潑にする物質を分離したと興味ある報告をしている。彼等によると，この物質はステロールの一種 Cholestan-cis-ol-3 であり，ニシン卵を冷凍粉砕し，エーテルで抽出すると得られると言う。しかし甲子・小川はこの物質が卵のどこから抽出されたのか，又 1 個の卵からどのくらいの量とれるものかを明らかにしていない。筆者はまだ彼等の実験を追試していないので Cholestan-cis-ol-3 と卵門附近にあつて精子を活潑にするものとが同一物であるかどうか，こゝで論議する段階ではないと考える。

摘　　要

成熟したニシン卵の卵門附近には，精子を活潑にする特殊な要因（精子賦活要因）が存在する。この要因はリンゲル液を激しく吹きつけても除去されないから，卵膜と強固に結合しているものと思われる。しかし $CaCl_2$，$MgCl_2$，酸，トリプシン，高温などによつて比較的簡単に除去或は不活性化される。もし精子賦活要因が除去或は不活性化されると，卵自体がたとえ何の障害を受けていなくても，卵は受精不能になる。このことは精子賦活要因がニシンの受精にとり極めて重要であることを示している。

終りに臨み，本研究の緒端を与えられ，又本研究に対し種々の有益な御批判を戴いた北大理学部狩野康比

古博士並びに材料の提供その他に便宜を頂いた北海道区水産研究所・平野義見，北浜　仁，近藤平八の諸氏並びに同研究所嘱託・乳井善蔵氏に深甚の謝意を表する。

猶，実験に当つて山本　正・赤平幸王両氏（北大•理•動）の有益な助力を得たことを記して謝したい。

文　　　献

1) 柳町隆造： 動雑，**66**，222—225 (1957).
2) ———： 動雑，**66**，226—233 (1957).
3) ———： 動雑，**66**，218—221 (1957).
4) LILLIE, F.R. : "Problems of fertilization", Chicago Univ. Press, Chicago (1919).
5) TYLER, A. : Physiol. Rev., **28**, 180—219 (1948).
6) VASSEUR, E. : "The chemistry and physiology of the jelly coat of the sea-urchin egg", Emil Kihlström's Tryckeri, Stockholm (1952).
7) ROTHSCHILD L. "Fertilization", Methuen, London (1956).
8) LILLIE, F.R. : J. Exp. Zool., **16**, 523—590 (1914).
9) GLASER, O. : Biol. Bull., **41**, 63—72 (1921).
10) TYLER, A. and S.W. Fox : Biol. Bull., **79**, 153—165 (1940).
11) VASSEUR, E. : Acta Chem. Scand., **2**, 900—913 (1948).
12) ——— : Acta Chem. Scand., **6**, 376—384 (1952).
13) 甲子万里子・小川恕人： 医と生，**18**，184—187 (1951).

The Lowest Intensity of Illumination to Produce the Maximum Cone Potentiail in the Fish Retina and its Ecological Meaning

Tamotsu TAMURA, Genyo MITARAI* and Yuichiro SUGITA**
(*Fisheries Institute, Faculty of Agriculture, Nagoya University*)

Introduction

As already shown by SVAETICHIN (1953) and MITARAI & YAGASAKI (1956), the cone action potential in the fish retina which is evoked by the light stimulus can be recorded by ultramicro electrode method. The amplitudes of the evoked potentials can be changed by the various intensities of the light stimuli, *i.e.*, the cone response measured by the ultramicro electrode method is a graded response and does not follow the all or nothing law. The higher the intensity of light stimulation is, the larger the amplitude of the cone potential becomes. The amplitude, however, becomes constant at a certain intensity of illumination which is called in this paper "the lowest intensity of illumination" to produce the maximum amplitude.

"The lowest intensities" were measured in three species of fish and their relations to the ecology of the fish are discussed in the present paper.

Materials and Method

The eyes of *Sparus aries* (Sparidae, body length 20 cm), *Cyprinus carpio* (Cyprinidae, b.l. 25 cm) and *Lateolabrax japonicus* (Serranidae, b.l. 23 cm) were used as experimental materials.

The method of measuring the cone potential was essentially the same as that employed by SVAETICHIN and MITARAI & YAGASAKI, so only an outline need be given here.

The sclera and pigment layer were removed from the excised eye-ball. The rods extending into the pigment layer following previous light adaptation (100 watt electric lamp was used) were removed together with pigments, but the cones contracting at the time of preparation remained intact on the external limiting membrane. As shown in Fig. 1, the retina thus operated on was placed in a container filled with sufficient Ringer to allow immersion of half of the retina.

The material was then placed in a dark room and the ultramicro capillary electrode filled with 3 mol KCl, having the electric resistance of 10-50 MΩ, was inserted in a cone from the back of the retina and the potentials produced by light stimuli were measured by cathode follower used as input stages and direct current amplifiers.

Received Apr., 17, 1957

* The Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University.
** Ophthalmorogical Department, School of Medicine, Nagoya University.

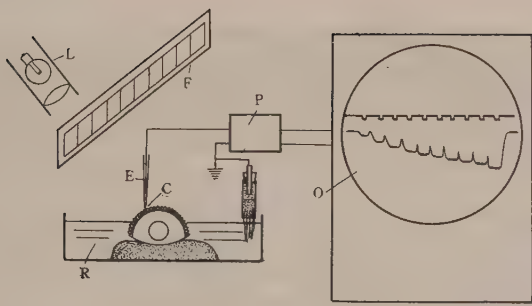


Fig. 1. Diagram showing the method of measuring the cone action potential. C : cone, E : ultramicro electrode, F : frame with filters, L : light source, O : oscilloscope, P : pre-amplifier, R : Ringer's solutton.

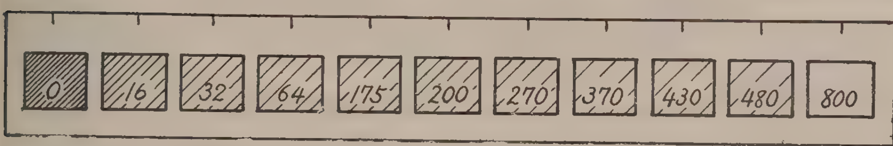


Fig. 2. The frame with various filters. The figure on the each filter shows the intensity (lux) of illumination when the filter is put in front of the light source.

The light stimulation was supplied by a tungsten lamp with various filters. The filters were made by photographic films which were exposed to light in nine grades. The intensity of illumination without any filter was 800 lux ; that with No. 1 filter, 480 lux ; with No. 2, 430 lux ; with No. 3, 370 lux ; with No. 4, 270 lux ; with No. 5, 200 lux ; with No. 6, 175 lux ; with No. 7, 64 lux ; with No. 8, 32 lux ; with No. 9, 16 lux.

These graded filters were put on a frame as show in Fig. 2. The experiments were carried out in such a way that after the tip of the electrode was inserted into a cone with the acid of a micromanipulator and being ascertained that a cone action potential was obtained with an amplitude of 20–30 mV by exposing the cone to a moderate light, the cone was subjected to a series of light stimuli of different intensities by moving the frame with filters in front of the lamp. The frame was usually moved from dark to bright filter during one sweep (ca. 4 sec.) of oscilloscope and then moved from bright to dark during the next sweep. In this experiment, a two beam cathode-ray oscilloscope was used for recording. The lower beam always displayed the phenomena, and the signals of light stimulation were emitted and recorded in the upper beam at regular intervals with a 1000 cycle oscillation sign wave indicating the center of the stimnlus.

Result

Typical records of the three species are shown in Fig. 3. From Fig. 3 A, A′, it is evident that in *L. japonicus* the stronger the intensity of light stimulation is, the greater the amplitude becomes, while in *C. carpio* (Fig. 3 B) the amplitudes become almost constant when the light stimuli are more than 175 lux. In the records of *S. aries* (Fig. 3 C)

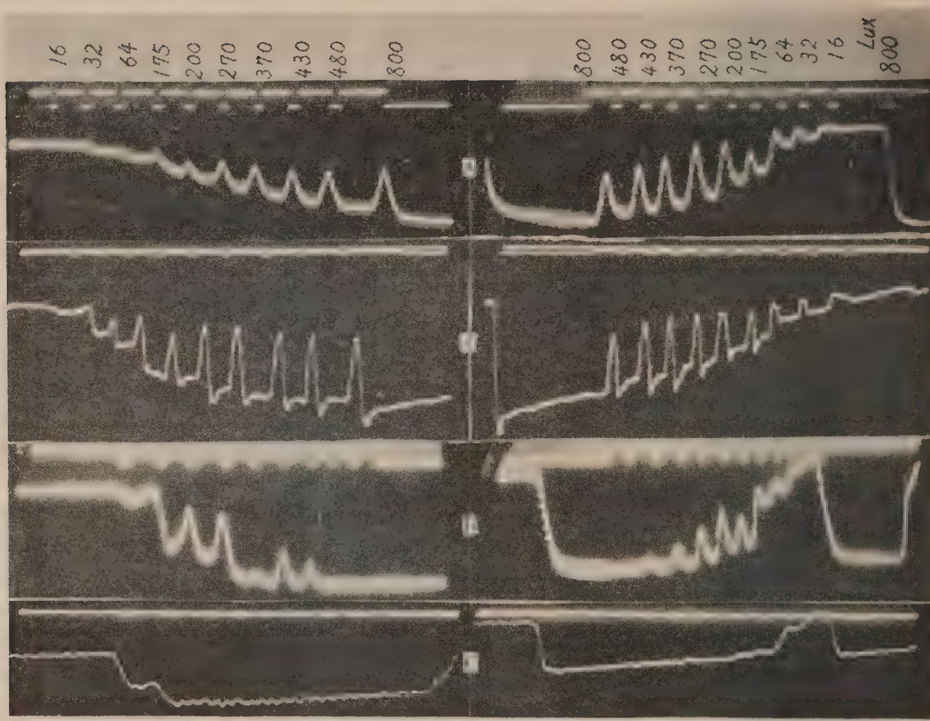


Fig. 3. The cone resposes to intermittent light gradually increasing (in reader's left) and decreasing (right) in intensity.

A and A′ : *Lateolabrax japonicus*, B : *Cyprinus carpio*, C : *Sparus aries.*

the amplitudes measured from the resting level are almost constant when the light stimuli are more than 64 lux, although the curve of amplitude runs a little upwards during each sweep as a result of a slight change of the resting level.

In Fig. 3 A′ (*L. japonicus*), particular oscillation can be seen in every evoked potential. These oscillations are considered peculiar to the cone itself, because their forms are all alike. The amplitudes were measured in this case from the resting level to the peak of the oscillations. In Fig. 3 C (*S. aries*), small irregular oscillations can be seen throughout the curves, they are the induction of oscillator, sometimes difficult to cancel, so the average line of the oscillations is adopted to measure the amplitude in this case.

For the most part, the curves of *S. aries* (Fig. 3 C) and a part of the curves of *C. carpio* (Fig. 3 B) when the light stimulus is strong, the complete fusion is seen in spite of the intermittent light stimuli produced by moving the frame with filters. Concerning the fusion, a little discussion will be made later.

To get the mean value of the "lowest intensities of illumination" to produce the maximum amplitudes in the three species, Fig. 4 A, B, C are prepared, where the relations betweem the amplitudes and the illumination intensities are illustrated. The amplitudes are given in per cent of the maximum response obtained (ordinates) in relation to the intensity of the light stimuli (abscissae; log. scale). From Fig. 4 A, it is concluded that "the lowest intensity" in *L. japonicus* is more than 800 lux, because of the almost constant increase

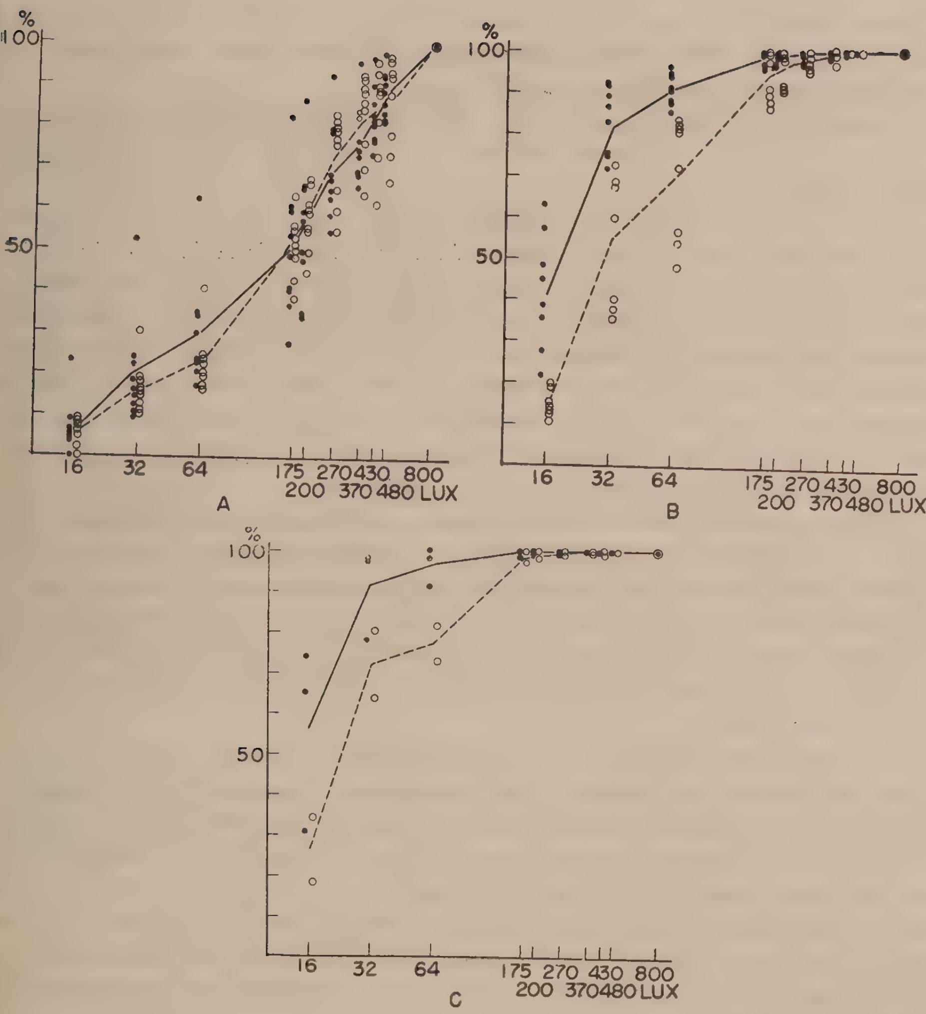


Fig. 4. The relations between the amplitudes (ordinates) and the illumination intensities (abscissae). Black dots and heavy lines indicate the relations when the filters are moved from dark to bright, and open circles and broken lines from bright to dark. A : *Lateolabrax japonicus*, B : *Cyprinus carpio*, C : *Sparus aries*.

of the curve throughout the experimental illuminations. From Fig. 4 B, C, it is possible to conclude that "the lowest intensity" in *C. carpio* is about 175 lux and that in *S. aries* is between 64 and 175 lux, because the curve (heavy line) runs parallel with the x-axis from the respective intensity in either case. The reason the heavy line curve only is used, will be discussed later.

Discussion

According to SVAETICHIN, the responese to the light stimulus described above is assumed to be the cone response, although there is no positive proof that the tip of the electrode

is inserted into a single cone. Even though the response is what is brought forth from any other order of retinal neurones, the content of this paper would not be valueless by substituting a suitable word for the word "cone".

MITARAI & YAGASAKI measured the intensity producing the maximum response in *Cyprinus carpio* to be nearly 150 to 200 lux. This value agrees well with the present value of 175 lux.

The broken lines obtained by changing flash intensity from bright to dark (Fig. 3 B and C) are always under the heavy lines obtained by changing from dark to bright. The reason may be as follows :— the strong light stimulation much more than "the lowest intensity" to produce the maximum response, may affect the cone activity and may result in decreasing the amplitudes of successive responses for a while; therefore, the heavy lines are only used to decide "the lowest intensity" of illumination. This reasoning may be supported by the fact that the heavy line and the broken line run along almost the same way in *L. japonicus* (Fig. 4 A) whose "lowest intensity" is supposed to be much higher than 800 lux which is the strongest stimulation in this study.

It may be assumed that the cone can discrimanate the intensities of illumination only when they are less than "the lowest intensity" to produce the cone maximum response. In other words, the cone may be excited fully when the illumination of the cone reaches "the lowest intensity", because there is no additional increase in the amplitude even though the intensity of the light is increased further. When the fish retina is illuminated by higher intensities of light than "the lowest intensity", the fish can hardly discriminate objects within the visual field.

Therefore, "the lowest intensity" of illumination to produce the maximum cone response may be useful as a measure of the environmental illumination which is suitable for the fish to live in. Since this intensity was measured as more than 800 lux in *L. japonicus*, as 175 lux in *C. carpio* and between 64 and 175 lux in *S. aries*, it may be concluded that these fish adapt themseleves to brighter environment in the above order. This conclusion may be supported by the fact that *L. japonicus* usually inhabits littoral clear water and takes food in daytime, while *C. carpio* lives usually in the turbid dark water and searches for food mainly by chemoreceptors and *S. aries* lives in somewhat deep sea and takes food chiefly in night-time.

TAMURA (1957) assumed that the cone sensitivity in *C. carpio* might be superior to that in *L. japonicus* because the shifting of the cone from dark- to bright-adaptation occured in lower illumination in *C. carpio* than in *L. japonicus*. This assumption harmonizes also with the present findings.

In the records of *L. japonicus* (Fig. 3 A, A′), the effect of intermittent light stimulus which is produced by moving the frame with filters is indicated in highest fidelity, in *S. aries* (Fig. 3 C) it is lowest and in *C. carpio* (Fig. 3 B) intermediate. Hence, it may be supposed that the flcker fusion frequency, which is a measure to indicate the ability to perceive the moving object, is highest in *L. japonicus*, lowest in *S. aries* and intermediate in *C. carpio*. Further studies will, however, be necessary to discuss it in more detail.

The authors wish to thank Mr. C. R. Lay for his kind help in writing manuscript

in English.

Conclusion and Summary

1) By the ultramicro capillary electrode, "the lowest intensity of illumination" for a single cone to produce the maximum action potential was measured in *Lateolabrax japonicus*, *Cyprinus carpio* and *Sparus aries*.

2) "The lowest intensity" in *L. japonicus* is more than 800 lux, that in *C. carpio* is about 175 lux and that in *S. aries* is between 64 and 175 lux.

3) From the standpoint that the intensity may be a measure to indicate the suitable light intensity for the fish to live in, it may be concluded that the three fish used in this study adapt themselves to the brighter environment in the order of *L. japonicus*, *C. carpio* and *S. aries*.

References

1) Svaetichin, G. : The cone action potential. *Acta physiol. Scand.*, **29**, Suppl. 106, 565—600, 1953.

2) Mitarai, G. & Yagasaki, Y. : Resting and action potentials of single cone. *Annu. Rep. Res. Inst. Environmental Med., Nagoya University, 1955*, 54—64, 1956.

3) Tamura, T. : On the relation between the intensity of illumination and the shifting of cones in the fish retina. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **22**, 742—746, 1957.

A New Contractile Protein of Squid Muscle
A Comparative Study with Carp Actomyosin*

Juichiro J. MATSUMOTO
(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

From investigation of the behaviors of the streaming birefringent protein in the aqueous extracts of the squid muscle and of the quantitative relationships between the said protein and some protein fractions in the squid muscle, an assumption was brought about that the observed streaming birefringence (SB) may be due to dissolving-out of the myosins** into the aqueous extracts[1]. The assumption became more probable by comparing the intensity of SB of these fractions with each other[2].

When the extract was dialysed against the solutions of various ionic strengths (I), an amount of the streaming birefringent protein was found to precipitate at $I=0.3$ and pH 6.8[3]. Thus, referring to the sofar described properties of muscle proteins of rabbit and carp[4][5], the existence herein of actomyosin-like protein was assumed. On the basis of that fact the author succeeded in separating and concentrating the actomyosin-like protein. Then experimental bases were requested to decide if it is indeed identical with actomyosin.

For this purpose, methods are given such as electrophoresis, ultracentrifuge, or comparison of some physico-chemical properties of the protein, as ROTH[6] and HAMOIR[7] did. They showed the respective identity of myosin and actomyosin of carp with those of rabbit which had been studied most profoundly. It was thought, however, more important to give attention upon their functional properties involved in the contraction of muscle, for these properties are the most specific ones to actomyosin.

For example, when adenosinetriphosphate (ATP) solution is added to actomyosin solution in 0.5~0.6 M KCl, a sudden decrease of viscosity and SB (the first phase), a duration of the low viscosity or weak SB (the second phase), and a recovery (the third phase) are observed successively. As to the mechanism of these changes, researchers share the view as follows[4][8][9] :

In the first phase, the shift to the right takes place in Equation (1) :

$$\text{actomyosin} \xrightarrow{+\text{ATP}} \text{actin} + \text{myosin} \qquad (1).$$

In the second phase, ATP is decomposed by the adenosinetriphosphatase (ATPase) activity of myosin or actomyosin as Equation (2) :

$$\text{ATP} \xrightarrow{+\text{myosin or actomyosin (ATPase)}} \text{ADP} + \text{P} \qquad (2).$$

Received Feb. 16, 1957.

* Contribution B No. 259, from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Fisheries Agency.

Read before the Meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries on Oct. 28, 1955.

** The word "myosins" was used here to include both myosin or L-myosin and actomyosin.

As soon as ATP is removed from the system, shift to the left in Equation (1) which results in the recovery of the viscosity and SB occurs.

Besides the above changes in solution, addition of ATP to the suspension of actomyosin gel in the media of lower ionic strengths ($I < 0.15$) causes a kind of syneresis called "super-precipitation"[10]. The ATPase activity to split ATP as Equation (2) is another functional property which is shared by both myosin and actomyosin.

In the present report, the ATP-response of SB, superprecipitation and some physico-chemical properties of the concentrated streaming birefringent protein fraction of squid muscle are treated and compared with those of carp actomyosin and the existence of acto-myosin in the said fraction is discussed.

EXPERIMENTAL

Methods

Unless otherwise stated, methods employed are same to the previous report[1].

Samples Mantle muscle of both male and female of common squid, *Ommastrephes sloani pacificus* STEENSTRUP, (body weight, 340~600 g.) was used: Sample squids were purchased at wholesale markets. When they came to hand, they were very fresh and occasionally alive, being used in experiment as early as possible. Carps, *Cyprinus carpio*, including both sexes, were of weight 120~150 g. : Extraction was done immediately after killed by cutting off the head, and using the dorsal lateral muscle.

Extraction To avoid the injurious effect of heavy metals[10], glass-redistilled water was employed ; metallic vessels and equipments were avoided ; centrifuging tubes were covered with paraffin-paper during the centrifugation. The most part of the treatments including extraction, fractionation and centrifugation (3,500~4,000 r.p.m.) was done in a cold room (0~8°C.) and by using an ice-water bath. Thus the temperature of the liquid was not raised beyond 10°C. even just after the centrifugation. The obtained sample solutions were kept in an ice-box.

Preparation of the squid protein The squid muscle was minced in a mortar and extracted repeatedly with cold water. From the extracts, ones which showed an intense SB were chosen and combined, added with KCl to 0.3 M and dialysed overnight against 3~6 volumes of 0.3 M KCl in a cold place. When the dialysate was centrifuged, some amount of the precipitate was obtained which, by adding an equal volume of 1.2 M KCl, becomes into an opalescent viscous solution showing an intense SB (Fig. 1). Table 1 shows the yield of protein in each fraction to the total muscle proteins. After the preparation was finished on the second day of the experiment, various tests were done whithin next 2 days using Fraction S_7. Dialysis against 0.3 M KCl as in the present work did not always give a good amount of the precipitate P_4 and a lower concentration of KCl such as 0.2 M might be more favorable as will be reported later.

Preparation of actomyosin of carp muscle According to the method of SZENT-GYÖRGYI[10] which was improved by WATANABE[11][12], minced carp muscle was extracted with WEBER-EDSALL's solution (0.6 M KCl, 0.04 M $NaHCO_3$, and 0.01 M Na_2CO_3) for 24 hours ; after centrifuging-off the residual proteins, actomyosin was precipitated three

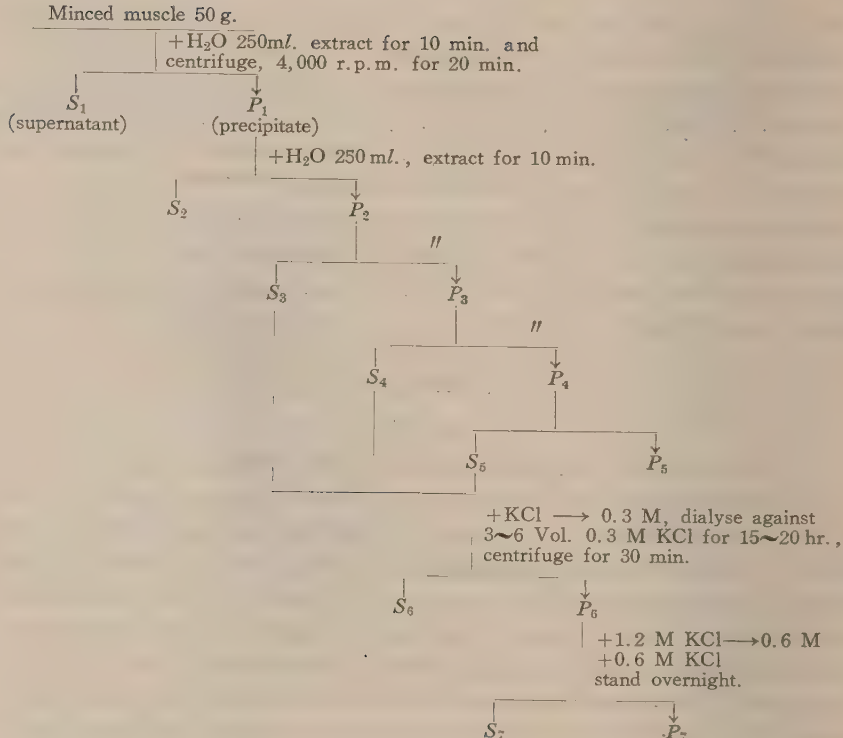


Fig. 1. Preparation of the streaming birefringent protein fraction in the aqueous extracts of squid muscle.

Table 1. A quantitaive aspect of the repeated extraction of squid muscle* with water

Extract	Volume (ml.)		pH	SB	Concentration mg. protein ml.	Yield		
	Extract	Ppt.				mg. protein g. muscle	% of total protein	
S_1	227	66	6.1	−	3.66	16.6	11.2	
S_2	172	88	6.2	−	1.79	6.2	4.2	
S_3	167	116**	6.3	+	1.62	5.4	3.7	
S_4	134	165**	6.5	+	2.27	6.1	4.2	**10.1**
S_5	125	193**	6.8	+	1.27	3.2	2.2	
S_7***	56	1****	6.7	+	4.42	6.1		**4.2**

* ♀ ; pH 6.1 ; total proteins, 14.8% ; Protein-N/total-N : 0.829 ; Sept. 26.
** These figures include the amount of the translucent paste described previously (C- and D-phases).
*** Concentrated fraction.
**** Probably denatured proteins.

times at 0.1∼0.2 M KCl, being washed twice with 0.05 M KCl ; the resultant white mass of the protein, which amounted to 26∼29 per cent of total muscle proteins, was dissolved into 0.6 M KCl solution. It showed an opalescent turbidity, a high viscosity and a marked SB ; the protein concentration, 12∼62 mg./ml. pH 6.5∼6.9.

Deternination of protein in solution Either semimicro-KJELDAHL method or biuret method[13] was used. Nitrogen content in the proteins was conveniently assumed as 16.0 %.

Streaming birefringence As reported by MIGITA and MATSUMOTO[1], a semiquantitative estimation was done using the instrument of OKADA and TADA[14]. For, in this method, to classify the intensity of SB into 3 stages, +, ±, and −, was found more reliable than to classify into 4 stages, +, ±, $\pm\!\!\!=$, and −, as described in the previous report, the classification into 3 stages was adopted as the routine method, in place of the other. To detect the ATP-response of SB, protein concentration was adjusted to nearly the lowest level which showed + pattern of SB in a series of repeating two-fold dilutions of the sample solution with 0.6 M KCl. To 8∼10 m*l*. of such protein solution, 0.5∼0.8 m*l*. of 0.025∼0.055 M ATP solution was added with or wthout the addition of 0.16∼0.2 m*l*. of M/20 $MgCl_2$, and SB was pursued.

Superprecipitation Protein solution was diluted with water to $I=0.1$, where the protein was lead to a turbid suspension. To 1∼2 m*l*. of the suspension, different amounts of 0.025 M ATP solution were mixed with or without adding 0.05 M $MgCl_2$ of 1/50 of its volume, the changes that follow during the storage at room temperature being observed and photographed.

ATP sample ATP-Na_2 of National Biochemical Corporation and ATP-Na_4 of Zellstoffabrik were used. The purity estimated by Δ 7 P was 72∼100 %.

Salting-in range Phosphate buffer ($I=0.125$, pH 6.8) 2 m*l*., KCl solution of various concentrations 7 m*l*., and protein solution in 0.5∼0.6 M KCl solution 1 m*l*. were mixed so that the resultant ionic strength of the mixtures varied from 0.05 to 0.5 and pH was kept near 6.8. After 2 hour cold storage, tubes were centrifuged (3,000 r.p.m., 20 min.) and protein concentration was determined.

Isoelectric point (p*I*) The precipitation optimum was measured by the following method, where the ionic strength was kept at 0.4 and 0.6 by adding KCl solution to increase the solubility of the protein in the neighborhood of p*I*. The mixtures were composed of acetate buffer of various pH values ($I=0.1$) 2 m*l*., 0.7 M KCl 2 m*l*., and protein solution (in 0.4 M KCl) 4 m*l*. ; after 1∼2 hour cold storage, the protein concentration and pH of the centrifuged solutions (3,000 r. p. m., 20 min.) were determined.

RESULTS

(A) Response of SB to ATP

ROTH[6] and HAMOIR[7] have reported the decrease in viscosity of carp actomyosin upon adding ATP, but the whole course of the ATP-response of viscosity or SB of fish actomyosin has not yet been reported. Thus the change of SB of the carp actomyosin was studied both at 20°C. and at 0°C. At the room temperature, SB disappeared immediately after the addition of ATP and meanwhile it was found again (Fig. 2, Curves B and C.). These courses suggest that changes in Equations (1) and (2) have taken place there. As the ATPase activity of rabbit actomyosin which catalyzes the reaction in Equation (2), is inhibited by Mg ion at this ionic strength, Curves D and E of Fig. 2 show that there

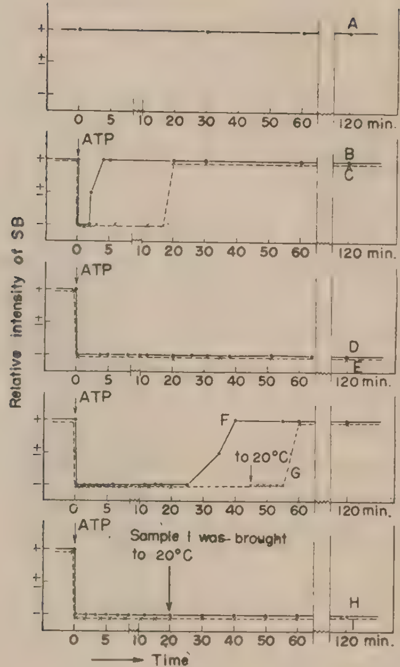


Fig. 2. Changes in SB of the actomyosin of carp muscle in 0.6 M KCl upon addition of ATP.

Date : Dec. 3 ; pH of fresh muscle : 7.0.

Curve	Pretein concn. (mg./ml.)	ATP (M)	$MgCl_2$ (M)	pH	Temperature (°C.)
A	1.6	—	—	6.6	20
B	3.2	0.0012	—	6.6	20
C	1.6	0.0012	—	6.6	20
D	1.6	0.0012	0.001	6.8	20
E	1.6	0.0012	0.001	6.6	20
F	1.6	0.0012	—	6.8	~0*
G	1.5	0.0023	—	6.6	~0*→20
H	1.6	0.0012	0.001	6.8	~0*
I	1.6	0.0012	0.001	6.8	~0*→20

* The solution was occasionally taken out from the ice both for the observation of SB.

was working a similar effect also in the case of carp actomyosin. When ATP was added at 0°C., Curves F and G, where Mg ion was absent, resembled to Curves B and C, but the second phase of Curve F was longer and that of Curve G did not finish until the mixture was brought to 20 C. The fact suggests that the ATPase activity was depressed at the low temperature. When Mg ion was added (Curves H and I), the once-disappeared SB did not restore as in the cases at room temperature (Curves B and C). The difference between Curves B and C, which is shown in the duration of the second phase, might be due to that the protein concentration, and therefore the concentration of ATPase, was higher in Curve B than in Curve C. In the case of Curve G, SB which did not restore in the cold did reappear as soon as the reaction mixture was brought to the room temperature : In Curve G, more ATP was used than in Curve F. These results would

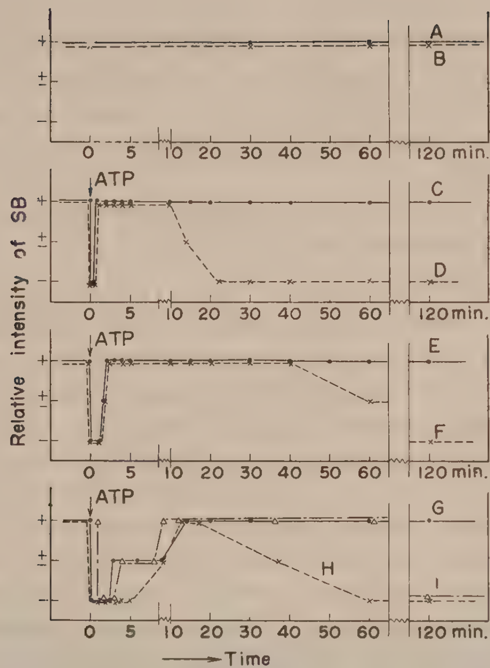


Fig. 3. Changes in SB of the streaming birefringent fraction in the aqueous extracts of squid muscle upon addition of ATP in 0.6 M KCl.

Date : A~F, Sept. 1 ; G~I, Sept. 27.

pH of fresh muscle : A~F, 6.4 ; G~I, 6.1.

Curve	Protein concn. (mg./ml.)	ATP (M)	$MgCl_2$ (M)	pH	Temperature (°C.)
A	2.1	—	—	6.6	24
B	2.1	—	—	6.6	~0
C	2.7	0.0012	—	6.8	24
D	2.7	0.0012	0.001	6.4	24
E	2.7	0.0012	—	6.7	~0*
F	2.7	0.0012	0.001	6.7	~0*
G	2.0	0.0024	—	6.2	23
H	2.0	0.0024	0.001	6.2	23
I	2.0	0.0024	0.001	6.2	~0*

* The solution was occasionally taken out from the ice-bath for the observation of SB.

prove that carp actomyosin responds to ATP in a similar manner to rabbit actomyosin. It would be also shown that the method estimating SB by use of this apparatus deserves to treat the ATP-response of actomyosin.

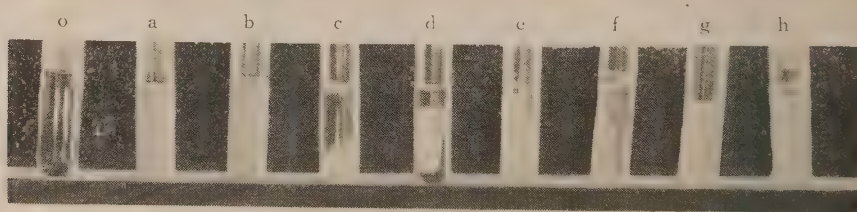
With the streaming birefringent fraction of squid muscle obtained by the method of Fig. 1, the results were as shown in Fig. 3. As Curve C in the figure shows, the change in the absence of Mg ion gave the same course with the case of rabbit and carp actomyosin. Thus it is suggested that the streaming birefringent fraction of squid muscle shows a similar SB response to ATP and also shows an ATPase activity. If the solution was ice-cooled, a change as Curve E was observed, wherein no difference was found except less quick recovery of SB than Curve C at the room temperature. The addition of Mg ion to the

squid protein gave no appreciable effect as shown in Curves D, F, H, and I, while Mg ion prevented the restoration of SB of carp actomyosin. Nevertheless, if SB was restored once, it resumed meantime to disappear which was not the case in the absence of Mg ion. Curves G, H and I were obtained with another lot of sample solution. It might involve a difference in ATPase activity of both preparations, that SB restored after a longer period there than in Curves C～F.

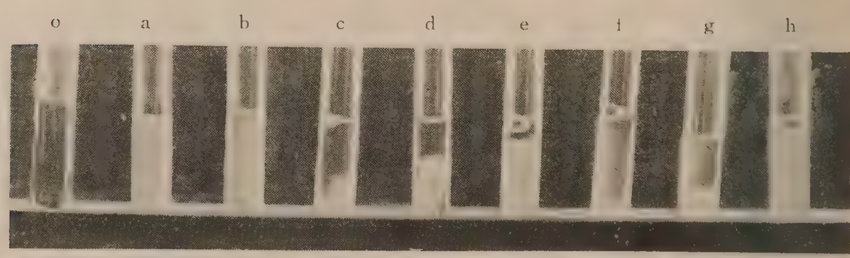
In these experiments 38～150 g. moles ATP per 10^5 g. carp actomyosin and 45～120 g. moles per 10^5 g-squid protein were used.

(B) Superprecipitation

As to the superprecipitation of fish actomyosin, no observation has yet been reported. In the present study, the carp actomyosin showed a typical superprecipitation as shown in Fig. 4 and Table 2 : If ATP was added in the absence of Mg ion to the protein suspension which was obtained by diluting the original solution to 6 times of its volume and to 0.1 M KCl concentration, the protein aggregated immediately, the aggregate shrinking, and forming a stopper-like precipite within 3 minutes. When 0.001 M Mg ion was present, the turbidity of the protein suspension decreased just after the addition of ATP, and the protein gradually aggregated into a suspension of fine particles within 30 minutes, and separated from the mother liquid within 1 hour, forming a compact precipitate a night after, but it remained in a fine-particled state. While a stopper-like precipitate was formed in the room temperature and without Mg ion, a fine-particled superprecipitate was obtained even wtihout Mg ion, if cooled with ice. Thus the carp actomyosin was found to make super-



(A) Three min. after adding ATP.

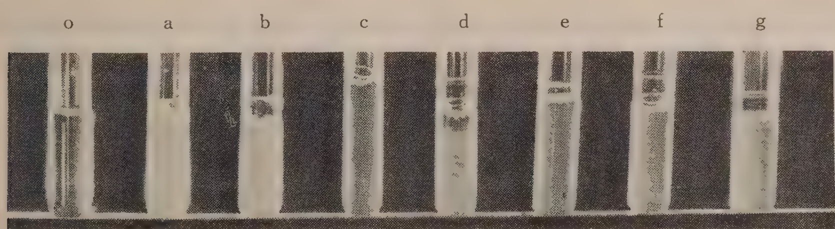


(B) Three hours after adding ATP.

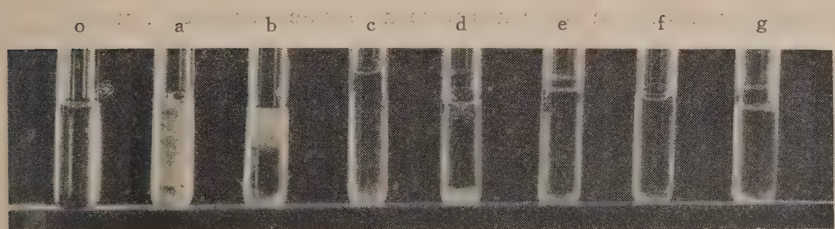
Fig. 4. Superprecipitation of carp actomyosin.
Date : Dec. 3 ; pH of fresh muscle : 7.0.
Tube o contains water as a control.
With tubes a～h see Table 2.

Table 2. Superprecipitation of carp actomyosin
Date : Dec. 3 ; pH of the mixtures : ~6.8.

<table>
<tr><th></th><th>a</th><th>b</th><th>c</th><th>d</th><th>e</th><th>f</th><th>g</th><th>h</th></tr>
<tr><td>Protein concn. (mg,/ml.)</td><td>2.2</td><td>2.2</td><td>2.2</td><td>2.2</td><td>2.2</td><td>2.2</td><td>2.2</td><td>2.2</td></tr>
<tr><td>ATP (M)</td><td>—</td><td>—</td><td>0.005</td><td>0.00125</td><td>0.000125</td><td>0.005</td><td>0.00125</td><td>0.000125</td></tr>
<tr><td>MgCl₂ (M)</td><td>—</td><td>0.001</td><td>—</td><td>—</td><td>—</td><td>0.001</td><td>0.001</td><td>0.001</td></tr>
<tr><td>KCl (M)</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td></tr>
<tr><td colspan="9">(Observation after adding ATP)</td></tr>
<tr><td>Immediately after</td><td colspan="2" rowspan="5">Turbid suspension</td><td colspan="2">Marked contraction stopper-like ppt.</td><td>Clear supernatant separates</td><td colspan="3" rowspan="2">Becomes transparent</td></tr>
<tr><td>10 min.</td><td colspan="2" rowspan="2">Contraction proceeds</td><td rowspan="2">Stopper-like ppt.</td></tr>
<tr><td>30 min.</td><td colspan="2" rowspan="2">Fine particled ppt. aggregates</td><td rowspan="2">Fine-particled suspension</td></tr>
<tr><td>3 hr.</td><td colspan="3" rowspan="2">Stopper like ppt.</td></tr>
<tr><td>20 hr.</td><td colspan="3">Fine particled compact ppt.</td></tr>
</table>



(A) Three min. after adding ATP.



(B) sixteen hours after adding ATP.

Fig. 5. Superprecipitaion of the streaming birefringent fraction of the aqueous extracts of squid muscle.
Date : Sept. 26 ; pH of fresh muscle : 6.1.
Tude o contains water as a control.
With tubes a~g see Table 3.

precipitation similar to rabbit actomyosin in literatures[10]*.

With the streaming birefringent fraction of squid muscle the results in Fig. 5 and

* In studying the superprecipitation, the author owed a detailed knowledge on the superprecipitation of rabbit actomyosin to the private communication of Prof. E. Miyazaki.

Table 3. Superpretcipiteion of the streaming birefringent fraction in the aqueous extracts of squid muscle

	a	b	c	d	e	f	g
Protein concn. (mg./ml.)	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74
ATP (M)	—	—	0.0042	0.00025	0.0042	0.0011	0.00024
$MgCl_2$ (M)	—	0.001	—	—	0.001	0.001	0.001
KCl (M)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
(Observation after adding ATP)							
Immediately after	Turbid suspension			Wool like suspension	Turbidity decreases		Turbid Suspension
10 min.			Clear supernatant separates	Pptn. begins	Suspension		
60 min.		Supernatant separates	Ppt. sets down				
16 hr.		Voluminous ppt.	Fine compact ppt.				

Tabe 3 were obtained, showing that the said fraction of squid does superprecipitate as carp actomyosin does. In this case a stopper-like precipitate was not formed even in the absence of Mg ion. While the sedimentation was more rapid in the absence of Mg ion, the precipitate when sedimentation finished was more compact in the presence of Mg ion.

ATP employed here amounted to 6∼200 g. mole per 10^5 g. protein in the case of carp actomyosin, and 33∼570 g. mole per 10^5 g. protein in the case of the squid preparation.

Experiments described in (A) and (B) will show that an actomyosin or an actomyosin-like protein is dissolved in the streaming birefringent fraction of squid.

(C) Superprecipitation in the crude aqueous extracts of squid muscle

The foregoing results showed that the aqueous extracts S_3∼S_5 of Fig. 1 contained an actomyosin-like protein. A superprecipitation study was then tried on the crude aqueous extracts (Fig. 6). To extracts S_1∼S_5 of Fig. 1, KCl and ATP were added to 0.1 M

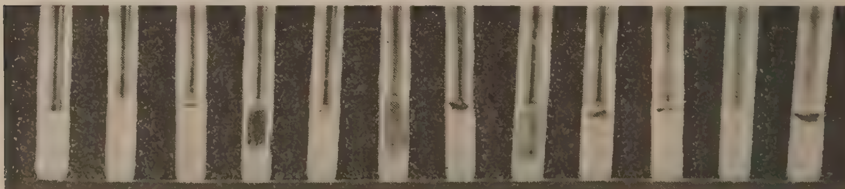


Fig. 6. Superprecipitation of the aqueous extracts of squid muscle. Picture 22 hours after adding ATP (0.00092 M) ; I=0.1 (KCl) ; pH∼6.5 ; Date : Sept. 26 ; pH of fresh muscle : 6.1. P_5 is the fluent suspension covering the surface of the centrifuged residue of the fifth extraction.

and 9.2×10⁻⁴ M respectively, and mixed. While, 10 minutes after mixing, only S_4 and S_5 showed separation of precipitate from the mother liquid, a night after, S_2~S_5 gave precipitates which were distinguishable from the controls. This suggested that an actomyosin-lik protein has been extracted as early as into S_2. Though, in S_5, the precipitate after sedimentation was less oompact than the control, the supernatant was more clear in the tube added with ATP, and it was suggested that a mild superprecipitation might occur also in S_5. The fluent suspension, P_5, that covered the residue of the fifth extraction (D-phase of the previous report[1]) shrinked to a stopper-like precipitate upon addition of ATP.

(D) Salting-in range and isoelectric point (p*I*)

To get further information, the salting-in range and p*I* were studied both on carp actomyosin and on the streaming birefringent fraction of squid.

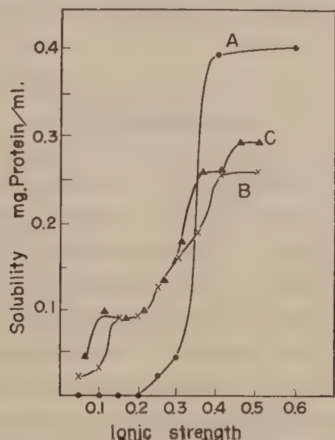


Fig. 7. The salting-in range of the carp actomyosin (Curve A) and the actomyosin like fraction of squid muscle (Curves B and C*).
Date ; A, Dec. 3 ; B, June 23 ; C, Sept. 1.
pH of fresh muscle : A, 7.0 ; B, 6.2 ; C, 6.4.
* The solution used in the experiment of A~F in Fig. 3.

As shown by Curve A of Fig. 7, the carp actomyosin began to dissolve at $I=0.25$ and at pH~6.8, reaching a maximum solubility at $I=0.4$. Such behavior is in accordance with the results of ROTH and HAMOIR, and the preparation treated here appears to be pure actomyosin.

The salting-in curve of the squid protein was as Curves B and C of Fig. 7 : These curves suggest that, besides the major fraction which have the salting-in range at $I=0.25$ ~0.4, there is a minor fraction which is soluble at the ionic strength as low as 0.15 and occupies some 30 % of the total protein in the solution. Thus the preparation is apparently not homogeneous. This point will be discussed later.

The p*I* of carp actomyosin was near pH 4.8~4.9 at $I=0.4$ and near pH 4.2 at $I=0.6$, while that of the squid protein was found near pH 4.7 at $I=0.4$: There is no significant difference between p*I* values of carp actomyosin and of the squid protein.

The p*I* value found on carp actomyosin, however, seems rather lower than p*I* of

actin-containing myosin of carp (pH 5.1~5.4) reported by several investgators[6)15)16)]. But with myosin of rabbit, it was suggested that p*I* is dependent on the ionic strength[17)], and the present data were obtained at the higher ionic strengths. Thus, the problem of the p*I* would be dealt with after an additional study.

DISCUSSION

(1) From the above results, the streaming birefringent fraction of squid appears to be similar to rabbit or carp actomyosins, in two respects, the ATP-response of SB and the superprecipitation. For these properties reflect the most important characteristics of actomyosin, it would be reasonable to say that the streaming birefringent fraction studied here contains an amount of actomyosin or an actomyosin-like protein, which plays a role in the contraction of squid muscle in vivo, and also shows mechanochemical responses on addition of ATP in vitro.

Besides these similarlities, the contractile protein of squid differs in some respects from rabbit actomyosin. Firstly, it is extracted easily with water at a definite condition, being held in the extract even after centrifugation, but precipitated if KCl was added to the concentration of 0.05~0.3 M. Secondly, in the SB-response on adding ATP, the once-disappeared SB did restore even in the presence of Mg ion, which is not the case with rabbit and carp actomyosins. Thus the ATPase activity of the actomyosin-like protein appears to be not inhibited by Mg ion. However, the protein preparation might be centaminated with "the water-soluble, Mg-activated ATPase[18)]", for it was prepared according to an scheme (Fig. 1), which was designed in view of getting a good yield of the actomyosin-like protein, and not in view of making an enzymatically pure preparation.

Another difference was observed that, if ATP was once added together with Mg ion, the once-restored SB of the actomyosin-like protein of squid, resumed to disappear within 2 hours (Fig. 3, Curves D, F, H and I) : The once-restored SB was stable if Mg ion was absent (Fig. 3, Curves C, E, and G). The cause of this difference is obscure, but it might be a characteristic of the squid protein, because a similar course of the ATP-response of viscosity was reported on myosin B extracted from the adductor of scallop[19)] which is not so remote from squid in biological classification. However, result of YAGI *et al.*[20)] should also be taken into account that myosin B fraction of scallop and other shellfishes appear similar to myosin B of rabbit in ATP-response of viscosity, superprecipitation and in ATPase activity.

As shown in Fig. 5, the actomyosin-like protein did not make a stopper-like superprecipitate but a fine-particled one which was observed with carp actomyosin only in the presence of Mg ion. It might be due to that the test of the squid pretein was done at a lower protein concentration than that of carp actomyosin, or to that a small quantity of Mg ion was contained in the preparation of the actomyosin-like protein of squid.

(2) The salting-in curve of the fraction S_7 used in this work contained one or two minor fractionsas much as some 30% of the total proteins (Fig. 7, Curves B and C). Then a question arises which component will be responsible for the actomyosin-like properties. It seems most probable that the major component which begins salting-in at the ionic

strength higher than 0.25 is it, as expected also from the salting-in behavior of rabbit or carp actomyosin. If a solution of the streaming-birefringent fraction of squid in 0.6 M KCl was stored in cold, the function to superpreciptate diminished day after day. In parallel to the diminution of this activity, the salting-in curve of the solution changed, suggesting that the major component is decreasing in amount while the minor ones are increasing[21]. This fact will favor the above view that the major component is the actomyosin-like protein.

(3) It is true that the actomyosin-like protein of squid showed functional characteristics of actomyosin as a contractile protein of muscle. However, it is also true that the protein has some properties deviating from actomyosins of rabbit or carp. Among these deviations a fact that the actomyosin-like protein is readily extracted from frech muscle with water is predominant. Since this property was found to be shared by the muscles of mollusks[22], the author proposes to call the protein tentatively by the name of "M-actomyosin" which means that there are some deviations from the properties of actomyosin of the striated muscles of rabbit and other animals.

SUMMARY

1) To prove the assumption that the streaming birefringence (SB) observed in the aqueous extracts of squid muscle is due to the dissolving-out of actomyosin or an actomyosin-like protein, the streaming birefringent protein was separated as a concentrated solution by precipitating it through dialysis against 0.3 M KCl. Then the properties of the protein were compared experimentally with those of carp actomyosin.

2) Whereas SB of carp actomyosin, on addition of ATP, showed a very similar response to that reported on rabbit actomyosin (Fig. 2), the streaming birefringent protein of squid behaved itself in a similar but distinct way, if Mg ion was present (Fig. 3).

3) Both carp actomyosin and the streaming birefringent protein of squid showed a typical superprecipitation (Figs. 5 and 6, Tables 2 and 3).

4) From salting-in curves, it was found that the used preparation of the streaming birefringent protein of squid contained one or two minor components, while that of carp actomyosin was homogeneous (Figs. 7).

5) It was inferred that, in the aqueous extracts of squid muscle, an amount of actomyosin-like protein is dissolved which has the functional properties of the contractile proteins. However, for some differences from actomyosins of rabbit and carp were found, and for these differences may be shared by mollusks, it was proposed to call this protein "M-actomyosin".

The author is indebted to Dr. M. MIGITA for his valuable advice, to Prof. S. MIZUSHIMA for tne encouragement to this work, and to Miss. A. YAMASHITA and Miss. M. AKIBA for their technical assistance.

References

1) MIGITA, M. and MATSUMOTO, J. J. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 641~52 (1954).
2) MIGITA, M. and MATSUMOTO, J. J. : Read before the Annual Meeting of the Chemical Society of Japan on April 3, 1954.

3) Matsumoto, J. J. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **23**, 47~52 (1957).
4) Weber, H. H. and Portzehl, H.: "Adv. Protein Chemistry", **7**, 161~247 (1952).
5) Bailey, K. : "The Proteins", Vol. 2, Part B, Academic Press, New York (1954), p. 951~1055.
6) Roth, E. : *Biochem. Z.*, **318**, 74~94 (1949).
7) Hamoir, G. : *Bull. Soc. Chim. Biol.* : **31**, 118~22 (1949).
8) Engelhardt, V. A. : "*Adv. Enzymology*", **6**, 147~91 (1947).
9) Mommaerts, W. F. H. M. : *J. Gen. Physiol.*, **31**, 361~75 (1948).
10) Szent-Györgyi, A. : "Chemistry of Muscular Contraction", Academic Press, New York (1947).
11) Watanabe, S. : "Standard Methods of Biochemistry" (in Japanese), Bunkyudo, Tokyo, 1953, p, 245.
12) Miyazaki, E., Terayama, Y. and Yutazaka, Y.: *Sapporo Medical J.*, **5**, 209~12 (1952).
13) Matsumoto, J. J. and Kanamitsu, T. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **21**, 284~8 (1955).
14) Okada, M. and Tada, S. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 224~34 (1954).
15) Mori, T. and Asakawa, S. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **12**, 62~72 (1943).
16) Suyama, M. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **15**, 507~14 (1948).
17) Sarkar, N. K. : *Enzymologia*, **14**, 237~45 (1950).
18) Mommaerts, W. F. H. M. : "Muscular Contraction", Interscience Publisher, New York (1950) p. 96.
19) Yokoyama, M., Terayama, Y. and Nagai, T. : *Kagaku*, **22**, 473 (1952).
20) Yagi, K., Sasaki, A. and Matsumiya, H. : *J. Jap. Biochem. Soc.*, **26**, 630~3 (1954).
21) Matsumoto, J. J. : Unpublished.
22) Migita, M., Matsumoto, J., Aoe, N. and Arai, T. : Read before the Meeting of the Jap. Soc. Sci. Fish. on Oct. 2, 1954.

Glycylglycine Dipeptidase に対する金属イオンの影響—III. Glycylglycine Dipeptidase の反応基に対する一考察

斗ケ沢宣久
（岩手大学農学部）

Effects of Metal Ions on the Glycylglycine Dipeptidase—III. On the Active Group of the Glycylglycine Dipeptidase

Yoshihisa TOGASAWA

Effect of sulfhydryl reagents on the activity of glycylglycine (GG) dipeptidase in pyloric caeca of bonito, tunny and yellow-tail was investigated.

The results were as follows :

1. The GG dipeptidase was inhibited by the addition of hydrogen sulfide and also hydrogen cyanide (Figs. 1 and 2).
2. The GG dipeptidase was inhibited by monoiodoacetic acid at 10^{-2}M, but not at 10^{-3}M and 10^{-4}M (Fig. 3).
3. The GG dipeptidase was inhibited by p-chloromercuribenzoate (PCMB) at 10^{-3}M, but only a little at 10^{-4}M and 10^{-5}M (Fig. 4).
4. The inhibitory action of PCMB was removed by the addition of cysteine (Fig. 5).

From these results, it is recognizable that sulfhydryl group is one of the active groups of GG dipeptidase in pyloric caeca.

魚類幽門垂の glycylglycine (GG) dipeptidase は他の同酵素と同様に Co^{++}, Mn^{++} により賦活される以外に Mg^{++} によつても賦活される事柄に関しては既に報告した如くである[1,2]。然し此の Mg^{++} による賦活は酵素液調製に当つて組織蛋白や，種々の金属イオンによつても影響せられると考えられるものであり，幽門垂中には相当量の Mg^{++} が含有され，而も其の大部分が酵素液中に移行する点などから此の影響については更に追試せねばならない問題である[3]。

尚 SMITH[4] は GG dipeptidase の Co^{++} による賦活作用を substrate—Co^{++}—enzyme 複合体の形成によるものと推測しているが，魚類幽門垂の同酵素の場合 Mn^{++}, Mg^{++} によつても同様な機構によつて賦活せられるものであるか疑問である。従つて著者は之等金属イオンによる賦活機構を探及する一手段として先づ幽門垂 GG dipeptidase に対する SH 試薬の影響に就き行つた実験の結果を報告する。

実験の部

基質として用いた glycylglycine (m. p. ; 215～218°C 全窒素 21.27 % 理論値 21.21 %) の合成，並びに基質溶液の調製は前報[1,2]と同様に行い，又実験の材料はマグロ (*Thunnus orientalis* TEMMINCK et SCHLEGEL), カツオ (*Katsuwonus pelamis* LINNÉ), ブリ (*Seriola quinqueradiata* TEMMINCK et SCHLEGEL) の幽門垂を用い前報に従いグリセリン抽出酵素液を調製した。

又酵素試験法も別に記入せざる限り前報の如く GRASSMANN & HEYDE の micro method[6] に準拠した方法で行つた。

1. GG dipeptidase に対する H_2S 並びに HCN の影響

-S-S- から SH えの還元試薬として H_2S, HCN (thiocyanate の成生を伴う) の影響を検した。此の中 H_2S は papain の場合に準じ，幽門垂グリセリン抽出液 10 cc を試験管にとり H_2S を1秒間に2泡の割に

1957 年1月 28 日受理

45 分間通じ，其の 0.2 cc を取り酵素試験に供した。

又 HCN の場合は KCN の 6 %溶液 10 cc を N-HCl で methyl red を指示薬として中和，全容を 20cc とし HCN 3 %溶液として使用し，其の 0.2 cc を反応液に加え酵素力を測定した。

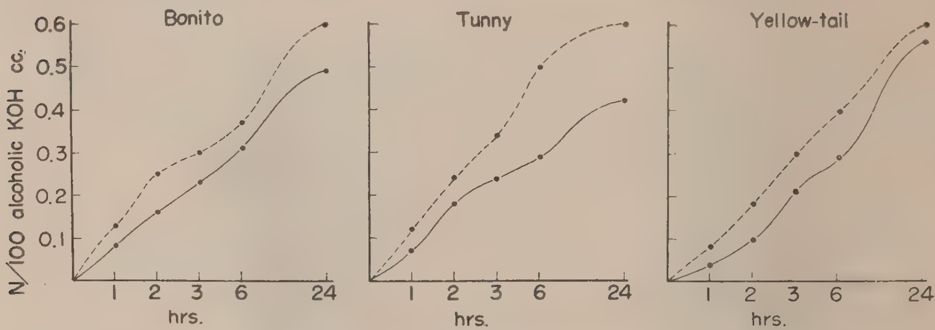


Fig. 1 Effect of hydrogen sulfide on the GG dipeptidase, extracted from the pyloric caeca

…•… Control —•— H_2S

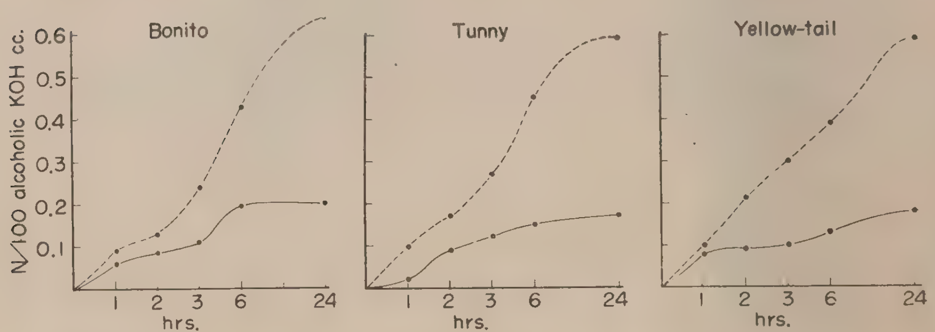


Fig. 2 Effect of hydrogen cyanide on the GG dipeptidase, extracted from the pyloric caeca

…•… Control —•— HCN

Fig. 1 は H_2S の影響を又 Fig. 2 は HCN の影響を示したものであるが何れの場合も -S-S- の還元に基づく酵素の賦活は認められず，寧ろ阻害作用が認められた。此の阻害作用は -S-S- の還元に基づくものか，或いは H_2S, HCN それ自体の影響であるか不明であるが，酵素液中の有効金属と結合し酵素作用を低下せしめたものとも考えられる。

2. GG dipeptidase に対する SH 試薬の影響

monoiodoacetic acid (IAc) は酵素に対する alkylation agent として SH group の閉塞に使用されているが，此の IAc の濃度を異にして最終濃度を夫々 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}M になる如く溶液を作りカツオ，マグロブリ幽門垂の GG dipeptidase に作用せしめた結果が Fig. 3 の如くで尚 control には同量の蒸溜水を使用した.

結果 IAc の GG dipeptidase に対する作用は最終濃度 10^{-2}M で著しい阻害が見受けられたが 10^{-3}, 10^{-4}M に於ては殆んど影響なく control と大差のない値が得られ，比較的高濃度で阻害する点などから一応 GG dipeptidase の反応基として SH group を考える事が出来るのであるが此の IAc は時として NH_2 基其の他とも反応する上に SH 酵素であつても阻害されない場合もあり又 SH えの可逆的回復が不可能など の欠点もあり此の結果のみによつては SH group の存在を推定する事は困難である。

従つて更に mercaptide の形成剤として用いられている p-chloromercuribenzoate (PCMB) を SH 阻害剤としカツオ，マグロ，ブリ幽門垂 GG dipeptidase に作用せしめた結果が Fig. 4 の如くである。即ち PCMB の最終濃度を 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} M になる如く調製し実験に供した。

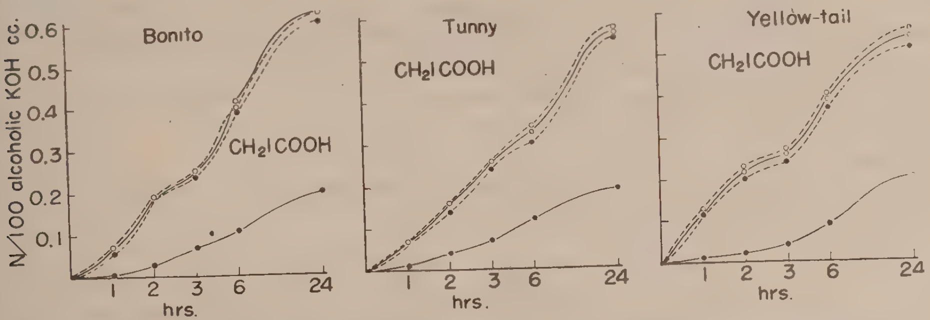


Fig. 3 Effect of monoiodoacetic acid on the GG dipeptidase, extracted from the pyloric caeca
…○… Control —○— 10^{-4}M …•…10^{-3}M —•— 10^{-2}M

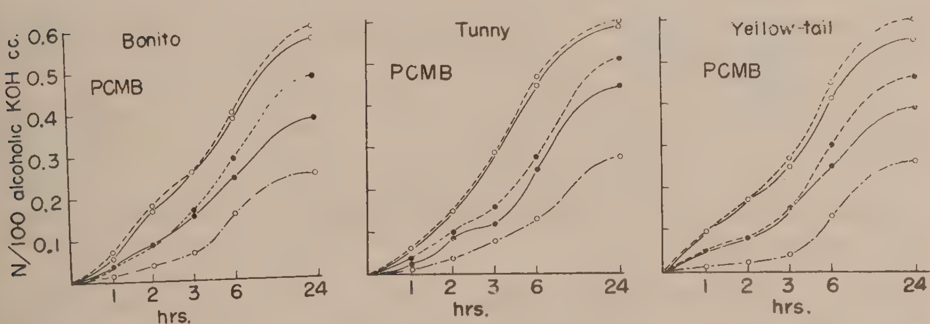


Fig. 4 Effect of p-chloromercuribenzoate on the GG dipeptidase, extracted from the pyloric caeca
…○… Control —○— 10^{-6}M …•… 10^{-5}M —•— 10^{-4}M —○— 10^{-3}M

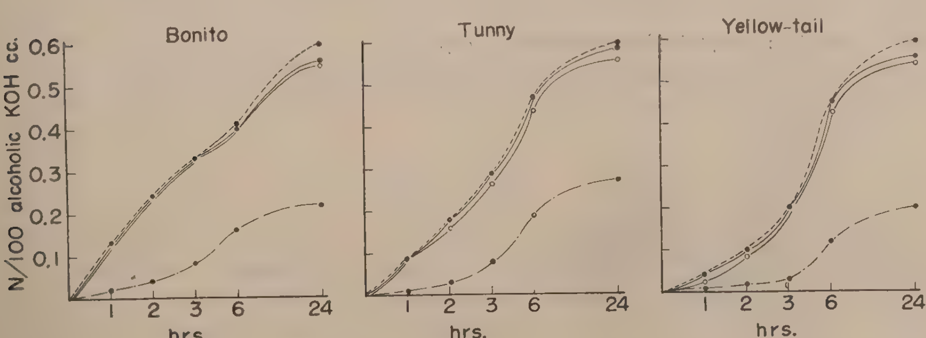


Fig. 5 Effect of p-chloromercuribenzoate on the GG dipeptidase of pyloric caeca in the presence of cysteine
…•… Control —•— Cysteine 10^{-3}M —○—PCMB 10^{-3}M+Cysteine 10^{-3}M
—•— PCMB 10^{-3}M

結果は何れの場合も 10^{-3}M で相当の阻害が見受けられ，10^{-4}，10^{-5}M に於ても尚阻害的に作用し，10^{-6} Mの低濃度に於て殆んど影響ないか幾分の阻害が見受けられる程度であつた。

尚 PCMB による阻害の可逆性に就いて cysteine を用い試験して見た結果が Fig. 5 に示す如くである。

試料は前実験と同様で，cysteine 単独の場合は最終濃度 10^{-2}Mで GG dipeptidase を極端に阻害するが 10^{-3}M の濃度では殆んど影響なく control とほぼ同じ結果が得られたので PCMB 10^{-3}M の阻害作用除去の目的の為に cysteine の 10^{-3}M 濃度のものを使用した。

即ちグリセリン抽出酵素液 0.2 cc に PCMB の最終濃度 10^{-3}M になる如く調製した溶液 0.2 cc を加え，10 分間室温に放置した後 cysteine の最終濃度 10^{-3}M の溶液 0.2 cc 加え 10 分間放置し，常法の如く酵素力を試験した。

結果はcysteine の添加により殆んど完全に PCMB による阻害作用が除去され，GG dipeptidase の反応基の一部として SH group を推定し得る結果が得られた。

要　　約

カツオ，マグロ，ブリ幽門垂グリセリン抽出液中の GG dipeptidase に対する SH 試薬の影響に就き試験を行つた結果次の事実が認められた。

1. H_2S 並びに HCN は阻害的に作用する。
2. IAc は 10^{-2}M で阻害的に作用するが 10^{-3}，10^{-4}M では殆んど影響が認められなかつた。
3. PCMB は 10^{-3}M で相当に阻害し 10^{-4}，10^{-5}M に於ても阻害作用が認められたが 10^{-6}M に於ては殆んど影響無いか或いは幾分阻害的に作用する様に見受けられた。
4. PCMB の阻害作用は cysteine の添加により殆んど完全に除去せられた。

以上の諸結果から幽門垂 GG dipeptidase の反応基の一部として SH group を推定し得る事実が認められた。

終りに臨みＰＣＭＢを分与下さつた東大農芸化学科藤巻正生氏に感謝の意を表す。本報の一部は昭和 31 年 4 月日本水産学会で講演した。

文　　献

1) 斗ケ沢宣久，勝又悌三：岩手大学農学部報告，**2**，66 (1954)
2) 斗ケ沢宣久，勝又悌三：本誌，**21**，1070 (1956)
3) 斗ケ沢宣久：日水会大会講演（昭和 30 年 4 月）
4) E. L. SMITH：*J. B. C.* **176**，21 (1948)
5) 斗ケ沢宣久：日農化東北支部会講演（昭和 30 年 8 月）
6) W. GRASSMANN，W. HEYDE：*Z. physiol. Chem.*，**183**，32 (1929)

Glycylglycine Dipeptidase に対する金属イオンの影響—IV.*
SH 化合物と金属イオン殊に Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} の関係に就いて

斗ケ沢 宜久
(岩手大学農学部)

Effects of Metal Ions on the Glycylglycine Dipeptidase—IV. On the Interaction between Sulfhydryl Compounds and Metal Ions, especially Co^{++}, Mn^{++} and Mg^{++}.

Yoshihisa TOGASAWA

The present investigation was made spectrophotometrically to clear up whether cysteine and thioglycolic acid form coordination complexes with Co^{++}, Mn^{++} and Mg^{++} or not.

The results were as follows :

1. Cysteine with Co^{++} forms a water soluble coordination complex in the ratio of 3 : 1 at pH 5–8, showing an absorption maximum at 360–365 mμ (Figs. 1 and 2).
2. Thioglycolic acid with Co^{++} forms a water soluble coordination complex in the ratio of 3 : 1 at pH 5–8, showing an absorption maximum at 370–380 mμ (Figs. 4 and 5).
3. On the other hand, no change was observed in the absorption spectra, when cysteine or thioglycolic acid was mixed with Mn^{++} or Mg^{++} (Figs. 7–10).

幽門垂 glycylglycine (GG) dipeptidase は Co^{++}, Mn^{++} により賦活される外に特異的に Mg^{++} により賦活せられる[1,2]。

Co^{++} による賦活機構に関しては既に SMITH[3] により substrate-Co^{++}-enzyme 配位化合物の形成が推測されているが，此の際酵素の如何なる反応基が Co^{++} との結合に関与するものであるか一応考慮せねばならない問題である。然し未だ結晶状に分離されておらない該酵素の場合，単なる予測として種々考えられる反応基の中，前報[4]に従い SH 基を推定し，SH 基が此の結合の一部に関与しているだろうとの考えから先づ予備実験として SH 基を有する化合物として cysteine, thioglycolic acid を選び，此の SH 化合物が Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} と配位化合物を形成するか否か，又其の時の条件等を確める目的で行つた実験の結果に就いて報告する。

実験方法

塩類としては $CoCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$ の各 10^{-2}M 溶液を，又 SH 化合物としては cysteine-HCl, thioglycolic acid の各 10^{-2}M 溶液を調製し，塩類溶液 1 cc に対して SH 化合物溶液を 1〜5 倍の割合に 25 cc のメスフラスコに取り，夫々所要の緩衝液を加えて全液を 25 cc とし 2 時間室温に放置後其の 3〜4 cc を取り Beckman spectrophotometer で吸光度を測定した。

但し緩衝液は pH 3〜5 までは $CH_3COONa+HCl$, pH 6, 7 は KH_2PO_4+NaOH, 又 pH 8 は NH_4Cl+NH_4OH を使用した.

1957 年 1 月 28 日受理
* 昭和 30 年 8 月 日本農芸化学会東北支部会講演

結果並びに考察

1. Co^{++} と cysteine の吸収曲線

Co^{++} と cysteine の特有の吸収曲線を知る為に先づ $CoCl_2$ の $10^{-2}M$ 水溶液の吸光度を測定し，又 cysteine の場合は cysteine-HCl の $10^{-2}M$ 溶液 1 cc を 25 cc のメスフラスコに入れ，pH 8 の ammonium buffer で充たし其の吸光度を測定した．結果は次の如くである．

$10^{-2}M$ $CoCl_2$ 吸収極大 510 mμ，吸光度 0.049

$10^{-2}\times\frac{1}{25}M$ cysteine 吸収極大 210 mμ，吸光度 0.313

2. Co^{++} と cysteine 配位化合物形成時に於ける pH の影響

$10^{-2}M$ $CoCl_2$ 1 cc に対し $10^{-2}M$ cysteine 5 cc を 25 cc のメスフラスコに取り夫々を pH 3 から 8 までの緩衝液で充たし，其の各々の吸収曲線を描いて見た結果が Fig. 1 に示す如くである。

即ち $10^{-2}M$ $CoCl_2$ 1 cc に対し同濃度の cysteine-HCl 5 cc の混液を pH 3 の緩衝液で 25 cc に充たしたものの示す吸収極大は $CoCl_2$，cysteine-HCl 夫々単独の示す吸収極大とは全く異なる波長に新たに吸収の極大 360 mμ，吸光度 0.223 を生じ，pH を 4〜8 と変化せしめる事により吸光度が増大し，pH 5 から吸収極大 365 mμ となり pH 6〜8 に於て 365 mμ，吸光度 1.290〜1.300 間に於て略々一定した値を示す様になる．此の新たに生じた吸収極大は新物質の示すものと見做すべきであり，Co^{++} と cysteine の両者の結合により水溶性の配位化合物が形成せられたものと見做すべきである。又 pH 6〜8 に於ける吸光度が略々同一値であり，此の条件下に於て配位化合物の形成が完結されたものと認められるが pH 3〜5 間に於ては配位化合物の形成は認められるが不完全であると思われる。

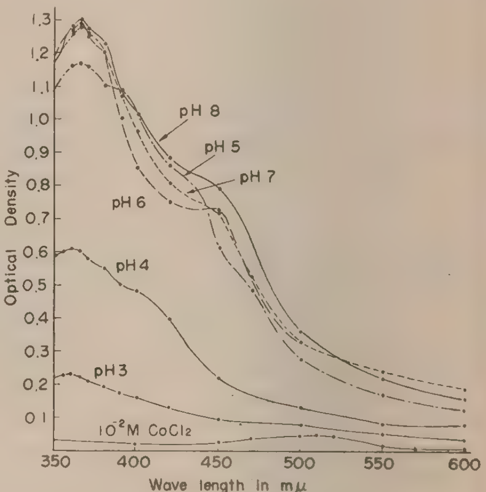


Fig. 1. Absorption curves of sample mixtures containing cysteine and Co^{++} in the ratio 5 : 1 at various pH.

3. Co^{++} と cysteine 配位化合物形成時の量的関係

$10^{-2}M$ $CoCl_2$ 1 cc に対し $10^{-2}M$ cysteine-HCl 1, 2, 2.5, 3, 4, 5 cc 即ち Co^{++} : cysteine の比率を 1 : 1, 2, 2.5, 3, 4, 5 の割合に夫々 25 cc のメスフラスコに取り pH 8 の緩衝液で充たし其の各々の吸収曲線を描いて見た。

結果は Fig. 2 の如くで Co^{++} : cysteine の比率が 1 : 1, 1 : 2, 1 : 2.5 の如く cysteine の量が増加するにつれて吸収極大 360 mμ に於ける吸光度が増大し，1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 に於ける吸収極大は 365 mμ で吸光度は夫々 1.30 で全く同じ値が得られ，Co^{++} 1 に対し配位化合物の形成にあづかる cysteine の量は 4 或いはそれ以上を必要とせず，cysteine 3 の割合で完結されるものと認められる．尚 pH 7 及び 6 の場合も pH 8 の場合と全く同様な結果が得られた。

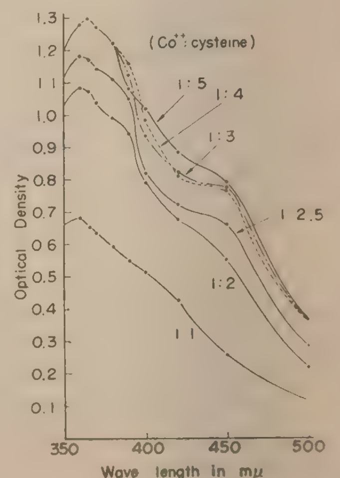


Fig. 2. Absorption curves of sample mixtures containing oysteine and Co^{++} in various ratio at pH 8.

尚 pH 5 に於ける吸収の極大は 365 mμ であるが吸光度が

pH 6〜8 の場合に比して小さく，此の条件下では配位化合物の形成が不完全と思われたが，Co^{++} と cysteine の比率を変化せしめて測定した場合の吸収極大は Co^{++} : cysteine＝1 : 3, 4, 5 の場合に 365 mμ, 吸光度 1.165 に於て全く一致した値が得られ，pH 5 に於ても 1 : 3 の比率に於て配位化合物の形成が完結されており，又 pH 4 の場合を吸収曲線で示すと Fig 3 の如く 360 mμ に於ける配位化合物の形成は認められるが Co^{++} に対する cysteine の増加と共に吸光度も増大し，pH 4 に於ける配位化合物の形成は不完全なものと思われる。

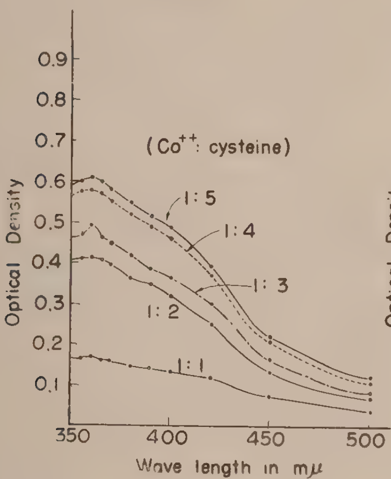


Fig. 3. Absorption curves of sample mixtures containing cysteine and Co^{++} in various ratio at pH 4.

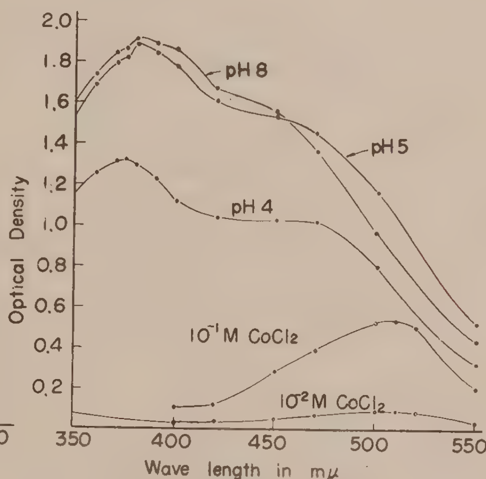


Fig. 4. Absorption curves of sample mixtures containing thioglycolic acid and Co^{++} in the ratio 5 : 1 at various pH.

結局 Co^{++} と cysteine の配位化合物は pH 5〜8 に於て 1 : 3 の割合で結合し形成されるものと思われ此の点 Michaelis 等[5,6] の結果と全く同一の結果が得られた。

4. Co^{++} と thioglycolic acid 配位化合物形成時に於ける pH の影響

thioglycolic acid 単独の吸収曲線は 10^{-2}M thioglycolic acid 1 cc を 25 cc のメスフラスコに取り pH 8 の緩衝液で充たし其の吸光度を測定した。結果は次の如くである。

$10^{-2} \times \frac{1}{25}$ M thioglycolic acid 吸収極大 212 mμ, 吸光度 0.397 又配位化合物形成時溶液の pH が如何に影響するかに就いて検討すべく 10^{-2}M $CoCl_2$ 1 cc に対し同濃度の thioglycolic acid 5 cc を 25 cc のメスフラスコに取り夫々 pH 4, 5, 8 の緩衝液で充たし，各々の吸収曲線を描いて検討した。今各 pH に於ける両混液の吸収曲線を示すと Fig. 4 の如くである。

即ち 10^{-2}M $CoCl_2$ 1 cc に対し同濃度の thioglycolic acid 5 cc の混液を pH 4 の緩衝液で 25 cc に充たしたものの示す吸収極大は $CoCl_2$, thioglycolic acid 夫々単独の示す吸収極大とは全く異なる波長に吸収の極大 375 mμ, 吸光度 1.31 を生じ，又 pH を 5 並びに 8 の緩衝液で充たした両混液の示す吸収極大は 380 mμ, 吸光度は夫々 1.89, 1.91 の如く近似した値が得られ，此の条件下に於て Co^{++} と thioglycolic acid の結合による配位化合物の形成が認められた。

5. Co^{++} と thioglycolic acid 配位化合物形成時の量的関係

Co^{++} と thioglycolic acid が配位化合物を形成する場合如何なる割合で結合に関与するかを試験する目的で 10^{-2} M $CoCl_2$ 1 cc に対し同濃度の thioglycolic acid 1, 2, 3, 4, 5 cc の割合に夫々 25 cc のメスフラスコに取り pH 8 の緩衝液で充たし各混液の吸収曲線を描いた結果が Fig. 5 の如くである.

即ち Co^{++} : thioglycolic acid の比率が 1 : 1, 1 : 2 の如く thioglycolic acid の量が増加するにつれて吸収極大 370 mμ〜380 mμ に於ける吸光度が夫々 1.071, 1.710 の如く増大するが 1 : 3, 1 : 4, 1 :

5 に於ける吸収極大は何れも 380 mμ で吸光度は 1.91 で殆んど同じ吸収曲線が得られ，此の条件下に於て Co^{++} : thioglycolic acid＝1 : 3 の割合で結合し配位化合物の形成がなされるものと思われる。

又 pH 5 の場合も Co^{++} に対する thioglycolic acid の比率が 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 の場合に於ける吸収極大は 380 mμ，吸光度は 1.89 で此の三者の吸収曲線が合致し，pH 8 の場合と同様に Co^{++} 1 に対し thioglycolic acid 3 の割合で配位合物の形成がなされる事実が認められた。

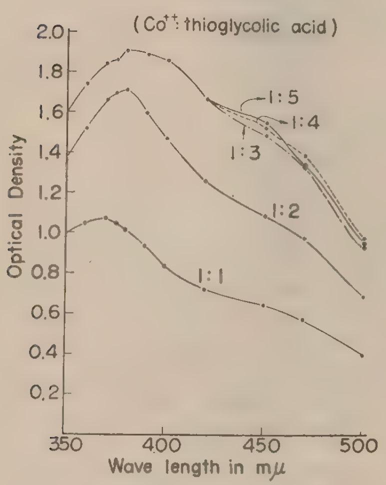


Fig. 5. Absorption curves of sample mixtures containing thioglycolic acid and Co^{++} in various ratio at pH 8.

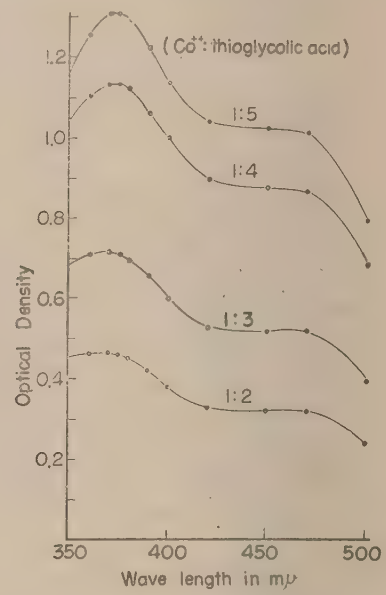


Fig. 6. Absorption curves of sample mixtures containing thioglycolic acid and Co^{++} in various ratio at pH 4.

尚 pH 4 の場合の両混液の比率を異にしたものの示す吸収曲線は Fig. 6 の如くで吸収極大 370～375 mμ に於ける吸光度が thioglycolic acid の増加に従い増加し，pH 4 に於ける配位化合物の形成は不完全なものと思われる。

結局 Co^{++} と thioglycolic acid は cysteine の場合と同様に pH 5～8 に於て Co^{++} 1 に対し thioglycolic acid 3 の割合で結合し配位化合物を形成するものと思われる。

6. Mn^{++} と cysteine との量的関係

Mn^{++} 単独の吸収曲線は $MnCl_2$ の 10^{-2} M 水溶液から求めたが吸収極大が 205 mμ より短波長部に生じ測定不可能であつた。

又 Mn^{++} と cysteine との関係に就いては 10^{-2} M $MnCl_2$ 1 cc に対し同濃度の cysteine-HCl 1, 2, 3, 4, 5 cc を夫々 25 cc のメスフラスコに取り pH 8 の緩衝液で充たし其の各々の吸収曲線を描いた結果を示すと Fig. 7 の如くである。

即ち Mn^{++} と cysteine 混液の示す吸収曲線は cysteine 単独の吸収曲線と略々同一であり，Mn^{++} に対する cysteine の増加と共に吸光度も増加し，両者間に配位化合物の形成は認められなかつた。

然るに Mn^{++} と cysteine-HCl の結合に関して Kroll[7] は Schwarzenbach 並びに Ackerman[8] の方法で測定し，pH 7.5 以下では結合の有無を断定し得ないが pH 7.8 以上に於て Mn^{++} 1 に対し cysteine 1 の割合で配位化合物を形成する事実を認めているが恐らく本実験に比し高濃度で反応せしめており，反応条件の相違も一原因をなしているのではないかと推定される。

7. Mn^{++} と thioglycolic acid の量的関係

Mn^{++} と thioglycolic acid が結合して配位化合物を形成するか否かを検する為，10^{-2} M $MnCl_2$ 1 cc に対し同濃度の thioglycolic acid 1，2，3，4，5 cc の割合に夫々 25 cc のメスフラスコに取り pH 8 の緩衝液で充たした混液の吸収曲線を示すと Fig. 8 の如くである。

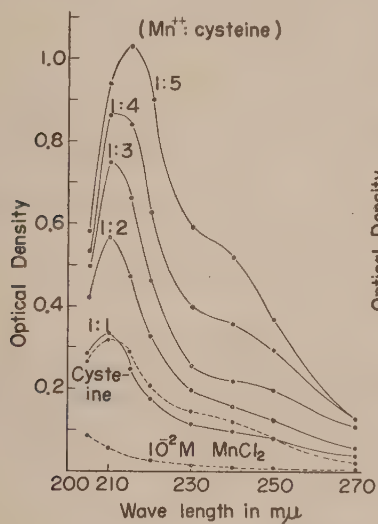


Fig. 7. Absorption curves of sample mixtures containing cysteine and Mn^{++} in various ratio at pH 8

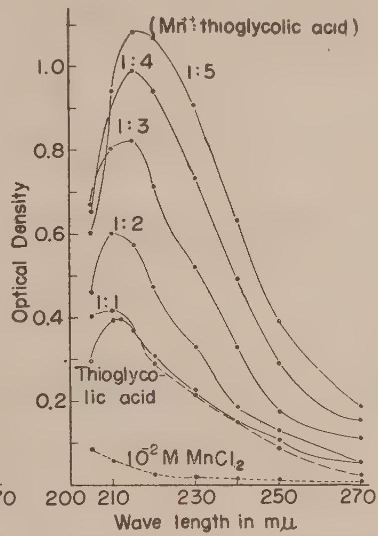


Fig. 8. Absorption curves of sample mixtures containing thioglycolic acid and Mn^{++} in various ratio at pH 8.

此の場合も両混液の示す吸収曲線は thioglycolic acid 単独の吸収曲線と略々同一で，Mn^{++} に対する thioglycolic acid の増加と共に吸光度も増加し，両者間に配位化合物が形成されないものと認められた。

8. Mg^{++} と cysteine, thioglycolic acid の量的関係

Mg^{++} 単独の吸収曲線は $MgCl_2$ の 10^{-2} M 水溶液の吸光度を測定したが吸収極大は 205 mμ より更に短波長にあり測定不可能であつた。

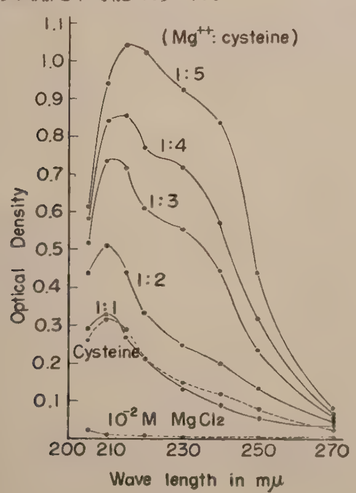


Fig. 9. Absorption curves of sample mixtures containing cysteine and Mg^{++} in various ratio at pH 8.

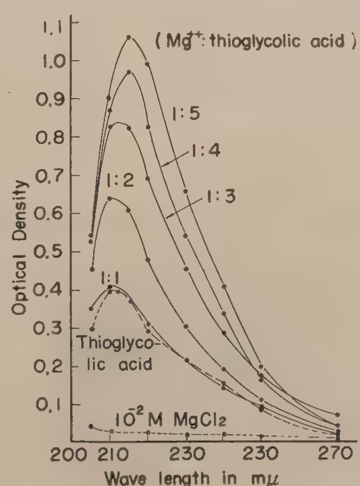


Fig. 10. Absorption curves of sample mixtures containing thioglycolic acid and Mg^{++} in various ratio at pH 8

尚 Mg^{++} と cysteine, thioglycolic acid の関係に就いては前同様に処理して其の吸収曲線を示したものが Fig. 9 並びに 10 の如くである。

Mg^{++} と cysteine 並びに thioglycolic acid の混液の示す吸収曲線は夫々 cysteine 或いは thioglycolic acid 単独の吸収曲線と略々同一で，両者の比率の増加と共に吸光度も増加し，Mg^{++} と cysteine 並びに thioglycolic acid 間には配位化合物が形成されないものと認められた。

要　　約

SH 基を有する cysteine, thioglycolic acid が Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} と結合して配位化合物を形成するか否か，又其の時の条件等に就き夫々の吸収曲線を spectrophotometer を用いて検討した結果次の事実が認められた。

1. Co^{++} は cysteine と pH 5〜8 に於て Co^{++} 1 に対し cysteine 3 の割合で結合し吸収極大 360〜365 mμ の水溶性配位化合物を形成する。

2. Co^{++} と thioglycolic acid も同様に pH 5〜8 に於て Co^{++} 1 に対し thioglycolic acid 3 の割合で結合し吸収極大 370〜380 mμ の水溶性配位化合物を形成する。

3. Mn^{++} と cysteine, thioglycolic acid の配位化合物の形成は認められず

4. Mg^{++} も cysteine, thioglycolic acid との配位化合物を形成しないものと認める。

尚以上の結果は cysteine 並びに thioglycolic acid 其の物との反応であり，此の際反応に直接関与する反応基としては SH 基以外に COOH 基，NH_2 基等も考慮せねばならず，此の間の問題に関しては後報する予定である。

文　　献

1) 斗ケ沢宣久，勝又悌三：岩手大学農学部報告，**2**，66 (1954).
2) 斗ケ沢宣久，勝又悌三：本誌，**21**，1070 (1956).
3) E.L. Smith : *J.B.C.* **176**, 21 (1948).
4) 斗ケ沢宣久：本誌，**23**，105 (1957).
5) L. Michaelis, E.S. Guzman Barron : *J.B.C.* **83**, 191 (1929).
6) L. Michaelis, S. Yamaguchi : *J.B.C.* **83**, 367 (1929).
7) H. Kroll : *J.A.C.S.* **74**, 2034 (1952).
8) G. Schwarzenbach, H. Ackerman : *Helv. Chim. Acta.*, **30**, 1798 (1947).

魚類肝臓貯蔵時のビタミンAの減少に対する肝臓含有酵素の影響

清水千秋・福原忠信
(長崎大学水産学部)

Influence of the Liver Enzyme on the Decrease of Vitamin A in the Fish Liver during Storage

Chiaki SHIMIZU and Tadanobu FUKUHARA

The causes of the decrease of vitamin A in mackerel liver during storage are considered to the actions of enzyme and hemin contained in the liver. (Fig. 1). The mechanism of vitamin A oxidation by this enzyme and hemin is considered as follow: the portion of —CH=CH—CH_2—CH=CH— in linoleic acid or linolenic acid is oxidized to hydroperoxide at first then it oxidizes vitamin A secondarily, similarly to the vegetable lipoxidase (Fig. 2, Fig. 4, Fig. 5).

緒　言

魚類並びに獣肉等を低温貯蔵した場合組織中のビタミンAが減少することについては森・浅川[1], SANFORD[2] and MIYAUCHI[3] 等多くの報告がある。著者等[4]もサバ及びサメの肝臓を貯蔵試験したところ酸価，過酸化物価，ビタミンAが低温でもかなり変化する事を明らかにした。BANKS[5]，小野・永山[6),7]は肝臓貯蔵中における過酸化物価の増加並びにビタミンAの減少をリポキシダーゼ様酵素の作用ではないかと報告しており，また該酵素が動物組織中に存在する事については LEA[8]，HOVE[9]，ELMAN[10]，ALBERT[11]，KHAN[12]，等多数の報告がある。しかし BOYED, and ADAMS[13] は牛，豚の筋肉，ネズミの肝臓，腎臓，心臓，脳，肺臓中にはリポキシダーゼが認められず，今迄リポキシダーゼと考えられていたのはヘミン色素の触媒作用であるとのべており，福場[14]もまた同様に報告している。

筆者等はサバ肝臓のビタミンAの酸化機構についてしらべ，リポキシンダーゼ様酵素の存在することおよびビタミンAの酸化は該酵素のみならず肝臓中に存在するヘミンおよび脂肪酸が関与すること等につき若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. サバ (*Scomber tapeinocephalus* BLEEKER) 肝臓酵素によるビタミンAの減少並びに過酸化物価の変化

新鮮なサバ肝臓をアセトン及びエーテルで脱水脱脂後粉末にし，これに15倍量のM/50燐酸緩衝液 (pH 6.5) を加えてホモゲナイズした乳化液 10 cc を 50 cc 三角フラスコに採り，これに 3% 卵アルブミン液 2 cc，サメ肝油 (ビタミンA：11,000 I.U./g，沃素価：175.8，過酸化物価：0.535) 3 cc，クロロホルム及びトルエン各々3滴を加え密栓後良く混合し夫々 30，0，−10，−20°C に一定時間貯蔵後 10 cc のエタノールを加え，エーテルで肝油を抽出してビタミンA及び過酸化物価の変化をしらべた。なお対照試験として 100°C，5分間煮沸した肝臓粉末乳化液を使用し，ビタミンAの測定は青山氏法[15]により，過酸化物価は WHEELER 法[16] で測定し N/20 $Na_2S_2O_3$ 滴定値で表わした。測定結果は Fig. 1 に示すようにビタミンAの減少は過酸化物価の増加に比例し，又貯蔵温度によつてかなりの差が認められる。対照試験でも

1956年7月11日受理

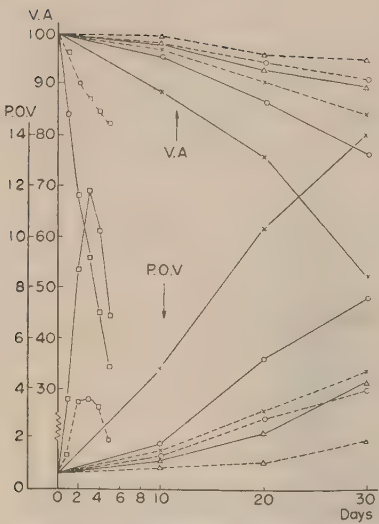


Fig. 1 Variations of vitamin A and peroxide value in the emulsion of defatted mackerel liver and shark liver oil at pH 6.5.
vitamin A : remains rate (%).
peroxide value : titration value of 0.05 N $Na_2S_2O_3$.
dotted lines : boiled defatted liver (100 °C., 5 min.)
□ : 30°C., × : 0°C., ○ : −10°C., △ : −20°C..

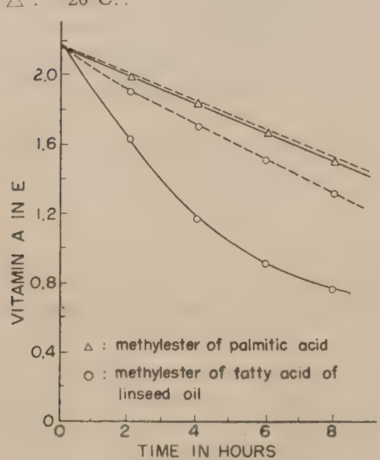


Fig. 2a Effect of fatty acid on the decrease of vitamin A by the crude mackerel liver enzyme (30°C., pH 7.0).
vitamin A : ca. 6 mg. acetone solution.
methylester of fatty acid : 60 mg. acetone solution.
dotted lines : boiled enzyme solution (100 °C., 5 min.).

ほゞ同じ傾向を示すが貯蔵温度による差はあまりいちじるしくない。

2. ビタミンAの減少に及ぼす脂肪酸の影響

酵素液 1で使用したサバ肝臓粉末 5g を水 200cc で 0 °C，一夜抽出し遠心分離した上澄液に水を加えて 200cc とした。

ビタミンA 約100万 I.U./g の合成ビタミンAパルミテートを鹸化して不鹸化物を石油エーテルに溶解し，アルミナのカラムクロマトグラフでビタミンAを分離し 6mg/cc のアセトン溶液とした。

亜麻仁油脂肪酸メチルエステル 局方亜麻仁油から脂肪酸を遊離し，エステル化後減圧蒸溜して主溜部分（沃素価：243.8，過酸化物価 0.005）を 60mg/cc のアセトン溶液とした。

パルミチン酸メチルエステル 試薬1級パルミチン酸をエステル化して減圧蒸溜し 60mg/cc のアセトン溶液とした。

オレイン酸メチルエステル 局方オリーブ油から脂肪酸を遊離し，鉛塩法で飽和脂肪酸を除いた後更にリチュウム塩法[17]で高度不飽和酸を除いたものをエステル化し，減圧蒸溜した主溜部分（沃素価：80.5，理論沃素価：85.7，過酸化物価：0.000）を 60mg/cc のアセトン溶液とした。

a. 50cc 三角フランコにビタミンA 6mg，脂肪酸メチルエステル 60mg，アセトン 1cc，酵素液 10cc，3% 卵アルブミン液 1cc 及び M/20 燐酸緩衝液 (pH 7.0) 2cc を加え良く混合して 30°C 定温器内で一定時間反応させた。なお対照試験には5分間煮沸した酵素液をホモゲナイズして使

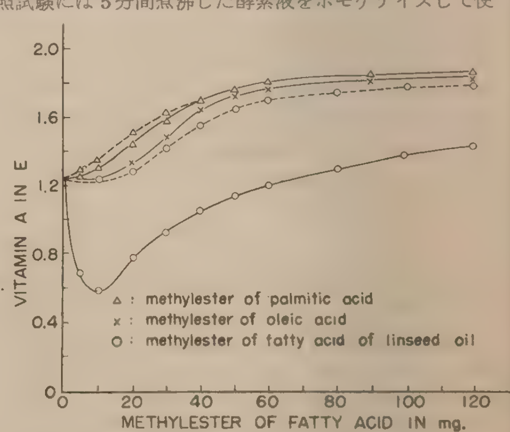


Fig. 2b Effect of fatty acid on the decrease of vitamin A by the crude mackerel liver enzyme (30 °C., pH 7.0, 4 hr.).
vitamin A : ca. 6 mg. acetone soution.
dotted lines : boiled enzyme solution (100°C., 5 min.).

用した。

b. 脂肪酸メチルエステルの添加量を変え，その外は **a** と同様にして 30°C，4 時間反応させた。

上の混合液を一定時間反応させた後各脂肪酸メチルエステルの同量を加え，1 分間振盪後 10 cc のエタノールを加え，一定量のエーテルでビタミン A 及び脂肪酸メチルエステルを抽出し，氷冷蒸溜水で水洗し脱水後溶剤を除きビタミン A を測定した。実験結果は Fig. 2 a 及び Fig. 2 b に示す如く酵素液によるビタミン A の減少は不飽和脂肪酸特にリノール酸，リノレイン酸が共存する時著しく，パルミチン酸或はオレイン酸が共存する時は殆んど対照値と同じ結果を得た。なお脂肪酸添加量を色々変えて反応させたところ酵素作用によるビタミン A の減少には脂肪酸量の多寡が関係することが認められた。

3. 肝臓粉末及び酵素液中のヘミン

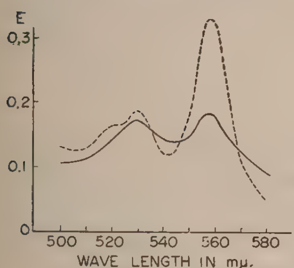


Fig. 3 Absorption spectra of protohemichrome (solid line) and pyridine extract of defatted mackerel liver (dotted line).

酵素液 100 cc にエタノール 50 cc を加え，殆んど乾固する迄減圧（15 mm Hg）濃縮し，これに 10 cc のピリヂンを加えて可溶物質を抽出した。また肝臓粉末 1 g を蒸溜水で湿らせ，ピリヂン 20 cc で同様抽出した。これらピリヂン抽出液と牛の血液から造つた結晶ヘミン[18] のピリヂン溶液との吸収曲線を比較したところ，Fig. 3 に示すようにピリヂン可溶部の吸光係数は 558 mμ でヘミンに比較してかなり大きく，また 520～525 mμ に鞍部が認められるがこれらはいづれも pyridine protohemochrome が含まれている為[19] と考えられる。したがつて 530 mμ で測定したヘミン量は多少高い値を示すものと考えられるが，測定結果は酵素液 10 cc 中 3～5 γ，肝臓粉末 0.25 g（酵素液 10 cc 抽出するに要した量）中 350 γ 程度である。なお 525 mμ で pyridine protohemochrome を測定した結果，hemo が全部 hemi に変化するものと仮定した場合酵素液 10 cc 中のヘミン量は 7 γ 程度になる。また上記酵素液濃縮物に N/10 KOH 10 cc を加えて全ヘマチン量を測定したところ，

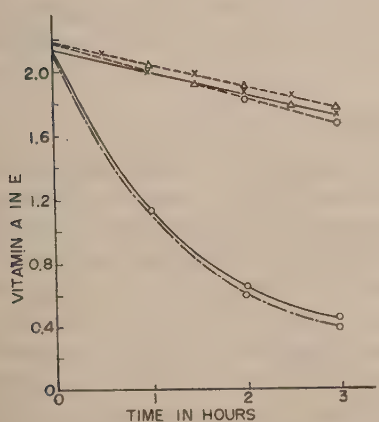


Fig. 4 a Effect of fatty acid on the decrease of vitamin A by the hemin (30°C., pH 7.0).
vitamin A : ca. 6 mg. acetone solution.
hemin : 1 mg. pyridine solution.
methylester of fatty acid : 60 mg. acetone solution.
dotted lines : 0 mg. hemin.
chain line : boiled hemin (100°C., 5 min.)

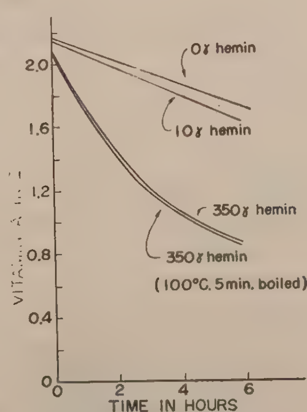


Fig. 4 b Effect of hemin on the decrease of vitamin A (30°C., pH 7.0).
vitamin A : ca. 6 mg. acetone solution.
methylester of fatty acid of linseed oil : 60 mg. acetone solution.

酵素液 10 cc 中 9 γ 程度であつた。

4. ヘミンによるビタミン A の酸化

a. 酵素液の代りに結晶ヘミンのピリヂン溶液 0.1 cc (ヘミン 1 mg) 及び水 2 cc を使用した外は **2 a** と同様に行つた。

b. 結晶ヘミンと 3% 卵アルブミン液の懸濁液を使用した。即ち **2** の酵素液の代りにこれと粘度の等しい 0.35% 卵アルブミン液 10 cc 及び一定量のヘミンを含んだ 3% 卵アルブミン液 1 cc を使用した外は **2 a** と同様に行つた。

上記混液を一定時間反応させた後エタノール 5 cc, 20% 酢酸鉛溶液 1 cc を加えてエーテル抽出を行い **2** と同じ方法でビタミン A を測定した。結果は Fig. 4 a 及び Fig. 4 b に示す様に反応液中にパルミチン酸メチルエステル及びオレイン酸メチルエステルが共存す時はビタミン A の減少は対照値と同程度であるが亜麻仁油脂肪酸メチルエステルが共存する時はかなり減少した。なおヘミン 10 γ 添加の時は無添加のものとあまり差が認められず, 350 γ 添加した場合 ビタミン A の減少は酵素液を使用した時 (**2**) と殆んど同程度である。

5. サバ肝臓酵素液及びヘミンによるクロチンの酸化

Sumner 及び Smith[20] は脂肪酸がリポキシダーゼで酸化された時生じた hydroperoxide でビキシン (bixin) が酸化される事を利用してリポキシダーゼの活性を測定しているが福場[21] はビキシンの代りに自動酸化されにくくしかも水溶性であるクロチン (crocin) を使用している。筆者等は局方サフラン蕊から抽出した粗製クロチンを使用し福場氏の方法でサバ肝臓酵素液及びヘミンの脂肪酸酸化を測定した。即ち 50 cc 三角フラスコにクロチン液 3 cc, M/15 燐酸緩衝液 (pH 7.0) 2 cc 及び 10% 脂肪酸メチルエステルのアセトン溶液 0.2 cc を加えて 30°C に暖め, これにヘミンのピリヂン溶液 0.1 cc (ヘミン 1 mg) を加え 30°C に保つた。なおヘミンの代りに **2** で使用した酵素液 2 cc を用い, 対照として 5 分間煮沸した酵素液をホモゲナイザーで乳化して使用した。上の混合液を一定時間反応させた後メタノール 10 cc 及び 20% 酢酸鉛 0.5 cc を加え遠心分離後イトー光電比色計で 480 mμ フィルターを使用して残存クロチンを比色定量した。実験結果は Fig. 5 に示すように亜麻仁油脂肪酸メチルエステルが共存する時のみクロチンが減少した。

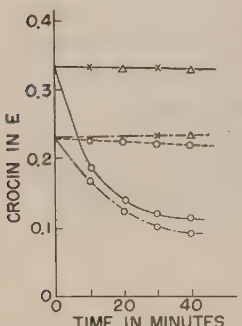


Fig. 5 Effect of crude mackerel liver enzyme (chain lines) and hemin (solid lines) on the decrease of crocin (30°C., pH 7.0). dotted line : boiled enzyme solution (100°C., 5 min.).

考察及び結論

Fig. 1 に示すようにサバ肝臓粉末は肝油の過酸化物価を増加させ, かつビタミン A を減少させる作用があり, かなりの低温でもなお作用するが, この作用は熱に不安定な酵素様物質及び熱に安定な他の物質によるものであり, 後者は **3**, **4** からヘミンと考えられる。前者のビタミン A 減少に対する酵素作用をしらべた結果, Fig. 2 a に示す如く不飽和脂肪酸特にリノール酸, リノレイン酸が共存する時著しく, パルミチン酸或はオレイン酸が共存する時は殆んど作用しない。なお脂肪酸添加量を色々変えて反応させたところ Fig. 2 b に示すようにビタミン A の減少にはリノール酸, リノレイン酸の量が関係する。以上 Fig. 2 a, Fig. 2 b の結果は Sumner[22] が大豆リポキシダーゼをカロチンに作用させたときの結果と全く同じであり, サバ肝臓酵素の作用も大豆リポキシダーゼと同様にリノール酸或はリノレイン酸のように分子中に $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ なる構造をもつた脂肪酸を酸化して生成した hydroperoxide がビタミン A を酸化するものと考えられる。Suellmann[23], Haurowitz[24] 等はヘミンの触媒作用で脂肪酸が酸化される事を報告しているが, 該酵素液中のヘミンの量は 1 γ/cc 以下であり, その酸化作用は Fig. 4 b にも示すようにごく僅かであり Fig. 2 a と比較考察すると該酵素液の酸化作用は殆んど酵素作用によるものであり, 混入しているヘミンの酸化作用は非常に少ないと考えてよい。もつともサバ肝臓中には相当多量 (ca. 300 γ/g) のヘミンが存在するから肝臓貯蔵中に於けるビタミン A の酸化に対してはヘミンもまた相当程度関係するものと考えられる。な

おヘミンの触媒作用によるビタミン A の酸化作用は Fig. 4a から明らかなようにリポキシダーゼによる酸化機構と全く同様である。しかし酵素液と異なり煮沸によつてその作用力が全然減少しない。クロチンに対するヘミン並びにサバ肝臓酵素の酸化作用を測定したところ，Fig. 5 に示すようにビタミン A の場合と全く同じ結果を得た。

既に KHAN[12] はニシンの血合肉中に，また小野，永山[7] はサバ肝臓にリポキシダーゼ様酵素が存在する事を報告しているが，以上私達の実験結果からも明らかにサバ肝臓中にリポキシダーゼ様酵素が存在し，サバ肝臓貯蔵中におけるビタミン A の減少は主としてヘミン及び該酵素が不飽和脂肪酸を酸化し，その酸化生成物によつてビタミン A が酸化される為と考えられる。

本研究を行うに当り御懇篤な御指導並びに御校閲を賜つた東京大学農学部教授農学博士森高次郎先生，分光光電比色計を使用させていたゞいた西海区水産研究所利用部長山田紀作博士に深謝する。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつた。併せて謝意を表する。

文　　献

1) 森，浅川：農化，**17**，529 (1941).
2) F. B. SANFORD, D. MIYAUCHI and I. JONSON : *Comm. Fish. Rev.*, p **2**, 11 (1947).
3) D. MIYAUCHI and F. B. SANFORD : ibid., p. **5**, 7 (1947).
4) 清水，福原：長崎大水産研報，**4**，21 (1956).
5) A. BANKS : *J. Soc. Chem. Ind.*, **57**, 124 (1938).
6) 小野，永山：本誌，**18**，509 (1953).
7) T. ONO and F. NAGAYAMA : *J. Tokyo Univ. Fish.*, **41**, No. **2**, 153 (1955).
8) C. H. LEA : *J. Soc. Chem. Ind.*, **56**, 376 (1937).
9) E. L. HOVE : *Science*, **98**, 433 (1943).
10) P. ELMAN : ibid., **110**. 591 (1949).
11) L. ALBERT : *J. Biol. Chem.*, **173**, 753 (1948).
12) M. M. R. KHAN : *J. Fish. Rese. Board Can.*, **9**, 393 (1952).
13) D. H. J. BOYED and G. A. ADAMS : *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **33**, 191 (1955).
14) 福場：酵素化学の進歩，第5集のⅡ，共立，東京，184 (1952).
15) 藤田，青山：ビタミン，**4**，127 (1951).
16) K. A. WILLIAMS : Oils Fats and Fatty Foods, **3** rd. ed., 53 (1951).
17) 上野，岡村：油脂実験法、丸善，東京，559 (1948).
18) 江上等：標準生化学実験法，文光堂，東京，113 (1953).
19) 江上等：同上，119 (1953).
20) J. B. SUMNER and G. N. SMITH : *Arch. Biochem.*, **14**, 87 (1952).
21) 福場：農化，**25**，485 (1952).
22) J. B. SUMNER and R. J. SUMNER : *J. Biol. Chem.*, **134**, 531 (1940).
23) H. SUELLMANN : *Helv. Chim. Acta.* **25**, 521 (1942).
24) F. HAUROWITZ, P. SCHWERIN and M. YENSON : *J. Biol. Chem.*, **140**, 601 (1942).

ビタミンKの抗菌作用機構—IV. 加水分解酵素に対するビタミンKの作用

北御門 学
（三重県立大学水産学部水産製造学教室）

Studies on the Mechanism of Antibiotic Action of Vitamin K—IV. Effect of Vitamin K on Hydrolytic Enzymes

Manabu KITAMIKADO

Previously the effect of vitamin K compounds on various enzymatic activities of *Escherichia coli* was studied, and the interfering effects of the compounds on the activities of enzymes involving SH groups were observed. In this paper the effect of the compounds on some microbial hydrolytic enzymes has been studied. And using certain enzymes, the active group or groups of which had been ascertained, some investigations were undertaken to demonstrate that the compounds never inhibit any other active groups of enzymes than SH.

(1) The activities of mold protease, yeast invertase, pancreas amylase and trypsin (active groups of these enzymes are amino, tyrosyl or certain groups and not SH) were not affected by the compounds even at a higher degree of concentrations than that which permits the microbes to grow.

(2) β-amylase, the active group of which is SH, was inhibited by the compounds.

(3) The only possible interfering point of the compounds with enzymes is active SH group.

ビタミンK化合物（以下 VK と略記）は SH 化合物と反応し，しかもこの両者間には微生物の増殖に対する拮抗作用があるので VK の抗菌作用は生体 SH 基の活性と関係のあることは明白である。さらに，微生物が生命を維持する為に必須な代謝系に対して VK がいかに影響するかを検討して VK の影響は SH 基が関与する系に対してのみ表われ，関与しない系に対しては認められなかつたならば "VK は SH 基の活動を阻害することによつて抗菌作用を示す" ということが一層明白になるであろう。著者は前報[1]で含有酵素の性質がよく知られている微生物として *Escherichia coli* を選びその代表的酵素作用に対する VK の影響を検討して，VK は SH 基が関与する酵素作用に対してのみ阻害作用を示すことを報告した。本報では酵素標本として *E. coli* では不適当であつた微生物加水分解酵素及び活性基が確定されている数種の酵素に対して VKがいかに影響するかを検討し，VK は微生物の増殖を阻害する程度の濃度においては SH 基の活性のみを阻害し，他の活性基に対しては阻害作用を及ぼさないことを確めた。

実験の部

1) *Aspergillus oryzae* の Protease

磨潰した大豆麹 10 gr を蒸溜水 100 ml で1時間浸出し濾過したものを原酵素液とした。蒸溜水 1 ml 中に原酵素液を 1 ml，1/2 ml，1/2^2 ml，……づつ含む酵素液を調製し，この酵素液を予め 30°C で 100 p.p.m. の VK_3 に1時間曝してから同濃度の VK_3 を含む 0.1% カゼイン液 3 ml づつを加え 30°C で1時間消化させた。完全消化の有無を醋酸アルコール6滴づつを加えて溷濁生成の有無で検した。対照として VK_3 を除いたものも同様に処理したが，VK_3 の有無に無関係に 0.25 ml 以上の原酵素液を含む酵素液によってのみカゼインは完全に消化された。VK_5，VK_3-Na-bisulfite についても同様に検討したが VK の影響は全

1957 年5月8日受理

く認められなかつた。

2) パン酵母の Invertase

パン酵母に 1/3 量の水及び 1/10 量のトルオールを加え 30°C で1時間放置後酵母と当量の水を加えてからアンモニアで中和しさらに 24 時間静置した。遠心分離して得た残渣を 30°C の水で洗滌し当量のトルオール飽和水を加えて 30°C で 15 時間自己消化させた。水で2倍に稀釈して遠心分離し，上澄液を醋酸で pH 4 となし濾過後の澄明液を苛性ソーダで中和して酵素液とした。

15 ml の 5% 蔗糖液と 1 ml の N/2 醋酸緩衝液 (pH 4.8) に一定量の VK を加えて全量を 19 ml となし，予め VK と1時間接触させていた酵素液 1 ml を加えた。30°C, 30 分後生成した転化糖を Bertrand 法で定量し Table 1 の結果を得たが VK は invertase の活性に全く影響しなかつた (Bertrand 法による還元糖の定量に VK が影響しないことは予め確めておいた)。

Table 1. Effect of vitamin K compounds on invertase activity of Baker's yeast

Vitamin K	Conc. of VK p.p.m.	Inverted sugar mg.
VK_3	100 200	21 22
VK_5	100 200	23 23
VK_3-Na-bisulfite	200 300	22 21
Control	0	22

3) 市販 β-Amylase

一定量の VK を含有する 25 ml の 5% 澱粉液と 10 ml の N/5 醋酸緩衝液 (pH 4.5) とに予め 30°C で VK に1時間曝した 1 ml の β-amylase 液 (0.5% 液) を 30°C で作用させて 10, 20, 30 分毎に反応液から 10 ml づつを採り生成した麦芽糖を Bertrand 法で定量した。その結果を Table 2 に示したが β-amylase は比較的高濃度の VK によつては阻害された。

Table 2. Effect of vitamin K compounds on the maltose production of β-amylase

Vitamin K	Reaction time / VK p.p.m.	Maltose mg. 10 min.	20 min.	30 min.
VK_3	50 100	34 29	74 61	95 78
VK_5	50 100	33 28	71 63	90 76
VK_3-Na-bisulfite	100 200	30 27	70 59	90 72
Control	0	33	71	94

4) 膵臓 amylase

市販 pancreatin を 20 倍の 87% グリセリンで 12 時間抽出し遠心分離後炭酸ソーダで中和した液を原酵素液とした。蒸溜水 1 ml 中に原酵素液を 1 ml, 1/2 ml, $1/2^2$ ml, ……づつ含む液を調製し，この酵素液を予め 30°C で一定濃度の VK に1時間曝してから同濃度の VK を含有する 1% 澱粉液 5 ml づつを加えた (反応液の pH は 6.8)。30°C, 30 分後 20 ml の水と N/10 ヨード液2滴づつとを加えて未糖化の澱

Table 3. Effect of vitamin K compounds on the starch digestion of pancreas amylase

VK p.p.m. \ Enzyme soln. ml.		$1/2^1$	$1/2^2$	$1/2^3$	$1/2^4$	$1/2^5$	$1/2^6$	$1/2^7$	$1/2^8$	$1/2^9$	$1/2^{10}$
VK_3	100	←					Yellow	Yellow∼Violet	Violet	→	
VK_5	100	←					〃	〃	〃	→	
VK_3-Na-bisulfite	200	←					〃	〃	〃	→	
Control	0	←					〃	〃	〃	→	

粉反応を検した。その結果を Table 3 に示したが VK は膵臓 amylase の活性には全く影響しなかつた。

5) Trypsin

市販 trypsin 粉剤の活性を WILLSTÄTTER 法[2] で測定し 1 ml の酵素液が trypsin 単位約 1 を示す如き酵素液を作製した。一定量の VK を含有する 6% カゼイン液 5 ml と NH_4OH-NH_4Cl 緩衝液 (1 N, pH 8.9) 2 ml を 30°C に保温したものに予め 30°C で VK に1時間曝した酵素液 1 ml を加えた。30°C, 20 分間に増加した酸を 0.2 N 苛性ソーダで滴定した結果を Table 4 に示したが, trypsin の活性は VK によつて全く影響されなかつた。

Table 4. Effect of vitamin K compounds on the casein digestion (increase of carboxyl group) of trypsin

Vitamin K	p.p.m.	0.2 N KOH ml.
VK_3	50 100	1.12 1.13
VK_5	50 100	1.10 1.15
VK_3-Na-bisulfite	100 200	1.09 1.13
Control	0	1.11

考　　察

本報で検討した種々の加水分解酵素は β-amylase を除いては VK によつて全く影響されなかつた。invertase の活性基については MYRBÄCK[3], SIZER[4], SIZER 及び FERNNESSEY[5] 等により amino 基と tyrosyl 基とが必須とされている。膵臓 amylase は WEIL 等[6] により amino 基が必須とされ, trypsin は FRAENKEL-CONRAT[7] により amide, guanidyl 及び indol 基が必須で carboxyl と tyrosyl 基は一部必須であり hydroxyl 基の必須性は未確定である。以上の酵素には SH 基の必須性が認められていないが, β-amylase は WEIL 等[6] によつて SH 基を必須とすることが報告され甘藷の β-amylase が VK_3 によつて阻害されることが別所[8] によつて報告されている。上記の酵素中で VK の阻害作用を受けたものは SH 基を必須とする β-amylase のみであり, *E. coli* の酵素活性に対する VK の影響を検討した前報[1] と同じく SH 基を活性とする酵素のみが VK によつて阻害された。一方 tyrosyl 基は比較的穏やかな酸化剤によつても影響され得るものであるにも拘らず invertase の活性が VK によつて阻害されないことは抗菌作用を示す程度の濃度においては VK はこの基の酸化能を持たないことを示すものであろう。また大部分の SH 基阻害剤は SH 基以外にも amino 基や tyrosyl 基をも阻害するものであるが, 以上の実験からも SH 基阻害剤の酵素活性基に対する攻撃は先ず最も反応性に富む SH 基に向うことが考えられる。なお β-amylase には 100 p.p.m. の VK_3 によつて阻害が表われたが前報での *E. coli* の種々の脱水素酵素は 14 p.p.m. といった低濃度の VK_3 によつても阻害されたのに比較して, 非常に高濃度の VK を必要としている。従つて SH 基を必須とする酵素中でも VK によつて阻害され易いものと阻害され難いものとが存在するわけである。

摘　　　　要

微生物の加水分解酵素及び活性基が判明している数種の酵素に対する VK の影響を検討して次の結果を得た。

1) 黴の protease，酵母の invertase，膵臓 amylase 及び trypsin の活性は微生物の増殖阻害を示す程度の VK 量によつては全く影響されなかつた。

2) これに反してその活性に SH 基を必須とする β-amylase のみは VK によつて阻害された。

3) 試験した酵素の活性基の検討から VK は SH 基のみを阻害することを指摘した。

本研究の一部は九州大学農学部水産化学教室において実施したものであり終始御指導を戴いた富安教授に厚く謝意を表する。

文　　　　献

1) 北御門　学，本誌，**21**，1076 (1956).

2) Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Dunaiturria, S. und Künstner, G., *Z. physiol. Chem.*, **61**, 191 (1926).

3) Myrbäck, K., *Z. physiol. Chem.*, **159**, 160 (1926) ; 160, 1 (1926).
Myrbäck, K., Sumner, J. B., *Z. physiol. Chem.*, **189**, 218 (1930).

4) Sizer, I. W., *Science*, **108**, 335 (1948).

5) Sizer, I. W., Fernnessey, J. F., *J. Biol. Chem.*, **188**, 351 (1951).

6) Weil, C. E., Caldwell, M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 212, 214, 1079 (1945).

7) Fraenkel-Coneat, H., *J. Biol. Chem.*, **177**, 385 (1945).

8) 別所　秀子，同志社女子大年報，**4**，156 (1954).

綜　述

最近の水中懸濁物測定法に就いて

古　川　　厚
（内海区水産研究所）

目　次

1. はしがき
2. 懸濁物の大いさ，量の測定
  a. 力学的方法
    i） 篩別け
    ii） 濾過
    iii） 沈降速度の利用
    iv） 遠心分離法
  b. 光学的方法
    i） 顕微鏡に依る方法
    ii） 散乱光を利用する方法
    iii） 透明度板の利用
    iv） 水中照度の利用
    v） 濁度の利用及び測定
    vi） 懸濁質係数
3. 懸濁物の化学分析法
    i） 乾物量の測定
    ii） 有機懸濁物の測定
    iii） Pigments Analyses
    iv） 懸濁物の Amino—酸

1. はしがき

水中に存在する微細懸濁物の研究は，所謂 Plankton 水中 Bacteria として，亦濁りとして可成古い時代から行われて来た。特に第二次戦争中，艦隊作戦上の必要から，海中の濁りに就いての研究は各国とも盛んに行つた様であるが，一切が極秘にされ，その成果に就いては知るよしもない。此の様た，いわば特種研究を除外し，一般的に考えると，微細懸濁物の研究は水塊区分のための指標として推進されたと同時に他方，水域の所謂 Basic Production に関係づけて行われて来た。之の外所謂海水科学的見地からの研究も勿論あるが，その数は前2者に比して多くない。

さて，吾々の属する水産的立場に於ける研究は，濁りと漁業との関係，或は漁業対象生物と微細懸濁物（餌料として）との関係等現実に可成注目されているにも拘らず，見るべき成果を挙げ得たとは必ずしも考えられない。今筆者の属する浅海養殖に就いて見ると，今日養殖対象動物として挙げられるものは主として Suspension Feeder と考えられる貝類である。従つて之れ等対象動物の生物的生産構造を明らかにするためには，餌料としての水中懸濁物の究明が重要な意義をもつ事は当然であろう。勿論以上の主旨のもとに行れた研究も極めて多いが[1),2)]，之れ等は主として，解剖学的摂餌機構の研究であり，実験室内での摂餌に対する懸濁物の影響に関する研究が多く，直接現場に於ける調査研究に至つてはその数は極めて少ない様である。D. L. Fox[3)] は California sea Mussel の胃内容物と棲息場所で採集される Diatoms 及び Dinoflagellates との関係を7ケ月間調査し，Dinoflagellates が極めてよく摂取される事を知り，且つ亦海水中に出現するものは大部分胃内容物中にも見られ，*Prorocentrum micans Ehr* 及び *Dinophysis* はその中でも特によく消化されていた。一方 Diatoms では Sedentary forms は海水中に見られる割合より貝の中に見出されるものの方が大きく，Pelagic forms では *Thalassiothix nitzschioides*, *Skeletonema costatum* を除いたほかの種類では，一般に胃内容物の方が小さい。更に興味深い結果としては両者とも小形のものが胃中に多く見られる事である。本研究は Plankton の餌料効果に就いて論議されていない。B. Jørgensen[4)] は数種の海産無脊椎動物に就いて吸水量と必要餌料量との関係を考察した。その結果 *Ostrea virginica*, *Ciona intestinals* 及び *Molgula manhattensis* は酸素 1cc をとるのに必要な海水は 10～20 *l* で之の海水中に含まれている懸濁物の量は体維持並びに成長には充分である事を結論している。花岡[5)] は筆者[6)] 等の結果にもとづき，アサリの生活に必要な餌料量を計算し，成長が水中に居る Plankton のみを栄養源としていない事を推定し，それ

以外の所謂懸濁質に依存している事を述べている。之れ等の報告以外にも Plankton 外の懸濁質が水中の生産に大きな役割を果している事を報じたものが多い。しかし之れ等の報告も推測的内容のものが多く，懸濁物が餌料としての価値を充分有する事，特にその量的質的観点からの実証的研究は少ない様である。その原因の一つに水中懸濁質の測定法の幼稚さがあげうるのではなかろうか。

以上の理由にもとづき，その測定法につき綜説して，今後の研究の資にしたいと考える次第である。何分にもその内容が多岐にわたらざるを得ないのに対し，筆者の限られた知識で取り纒めたため不備の点も多々あると思われるが，幸大方の御指導を得て今後の完璧を期したいと考える次第である。尚ほ本綜説取り纒めにあたり内水研所長花岡資博士並びに東大教授大島泰雄博士には御懇切なる御指導を添うした。此処に厚く感謝の意を表する次第である。

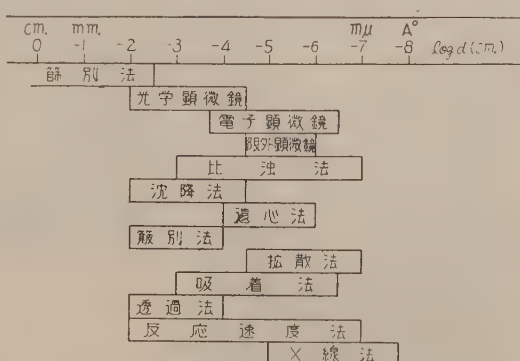
2. 粒子の大いさ，量の測定

水中懸濁物なる名称は，今回便宜上使用したもので，充分な定義づけがあるわけのものではない。Plankton を含めた水中微粒子を総称する名称は色々なものが使用されている[5]。その中で現在多くの人々に依つて使われているものは Particulated matter, Particulated material, Suspended matter 等であろう。本邦では余り多くの用語に接しないが，懸濁物或は懸濁質が用いられている様である。

懸濁物の内容は極めて雑多で Plankton, Bacteria 等所謂 living matter は勿論，動植物の死骸，その分解物，分泌物，或は所謂 Detritus, 底質起源の無機・有機物，空中陸水よりの色々の物質が含れている。何れもその大いさは余り大きくなく比較的小さく，μ 単位で示されるものである。Colloid の如く或る範囲の大いさのものに名付けられたものとは違い，非常に漠然とした総称的名称であり，之の事は一面研究の低次性を示すものとも考えられる。

斯くの如く水中懸濁物は，その起源から見ても粒子の大いさは，所謂均一分散系 (Monodisperse-Systeme) でなく，不均一分散系 (Polydisperse-Systeme) として考えられ，亦例え化学的に同一物質の粒子であつても，初粒子 (Primary Particle) 的なものもあり，更に之れ等の二次的粒子 (Secondary Particle) もあるであろう。亦異質粒子の集合体も考えられる。しかも水中では之れ等粒子の分離集合，分解等が不断に行われているものと考えざるを得ないので，その粒子組成に就いても常に動的状況のものとに把握する事が望ましい。

水中懸濁物の大いさを測定する方法も，他の分野で行つているものと原理的には同一である。今一般的に行われている粒度測定法を第1図に示した。之れ等すべての方法が，水中懸濁物測定に使用されているとは限らない。



第1図 各種の粒度測定法に依る測定範囲

a. 力学的方法

i) 篩別け

水中懸濁物に就いて篩を使用した事はない様であるが，後述する様な或る種の濾過剤を使用する場合の保護材として篩を用いた例は若干ある[8),9)]。標準篩が懸濁質の分別に使用されないのは前述の如く，その粒径が極めて小さい事によるわけで，周知の如く，泥粒組成の測定には極めて広く使用されている。Plankton-Net も一種の篩であるが，ここには省略した。

ii) 濾過

篩或は Plankton-Net にしても，之れを使用して得られる粒子は甚だ粗大なもので（普通 100 μ 以上）之れ以下の細かい粒子に対しては濾紙或は素焼板，Glass-Filter 等を用いる濾過，更に微細粒子に対しては適当な濾膜を用いている。

濾紙は一般に Whatman 濾紙が使用されている。之れは夫々の特長に依り No. 1 から大体 No. 52 迄が

主として使用され，概略の特長に就いては色々の Catalogue に示されているので使途に依り選択すればよい。たゞ目の大いさが厳密に規定出来ない欠点があるが，概略は濾別し得る結晶に依つて知り得るが，使用中濾過能，ひいては目の大いさが比較的変化し易い。

F.A. Armstrong & W.R.G. Atkins[10] は Whatman No. 50 を使用し筆者等[9]，は東洋濾紙No. 5A を使用し海水中の懸濁物を濾過採集した。浅海に於ける濾紙に依る濾過は最初の濾液約 1〜2 l と その後の約 20 l とでは，濁度が若干異たる場合があり，最初の保留が濾紙本来のものであるが，1〜2 l の 海水濾過では一般に濾別される懸濁物の量が少ないので約 20 l 以上を必要とする場合が多い。実際には最初の 1〜2 l に就いては再濾過をしている。

素焼濾過剤は硅藻土を主成分として作られ，濾過は無数の気孔に依り行われると同時に板中に発達した細路にも依る。G.L. Clark & H.R. James[12] は Berkeferd-Filter を海水調査に使用している。

Glass-Filter は硝子を粉砕し均一硝子粉を数 mm の厚さに半熔融せしめて作つたもので，普通 1 (約110 μ)，2 (60 μ)，3 (40 μ)，4 (5 μ) の 4 種がある。Glass-Filter を海水濾過に使用した例として菱田[12]，古川[13]，がある。使用目的に応じ色々の濾過器を選ぶ事が出来るが，筆者は自由に取り外す事の出来る Filter を小径の順に重ねて濾過する様にしている。之れは懸濁物の乾物量を概略知る上に便利である。

素焼濾過材及び Glass-Filter は手近に入手出来るものであるが，濾過速度の急激な減少のために多量の海水を処理する事は困難で，濾液の光学的特性，化学的性質等を検する場合には適するものと考える。

以上の外，特種 Filter として Gradocal-Membrane，Molecular-Filter 又は Membrane-Filter，或は各種粉末を使用する所謂 Powder-Filter 等が多く使用されている。

膠質膜は，最近之れにかわるべき市販品の可成良質なものが出廻つているので，手製する必要は少なくなくなつたが，製法に依り極めて区々の孔径が得られる便利がある。

町田[14]は東京湾調査に際して 3 % 膜を使用し，可溶性有機燐の研究をしている。

市販品の Membrane-Filter としては米国製の Molecular-Filter とドイツ製の Membrane-Filter とが比較的入手し易い。前者は別名を "Millipore-Filter" とも云う。本品は更に Hydrosol Assay type と Aerosol Assay type とにわかれている。之れを使用した例としては，里見[15] の淡水産 Plankton の定量法，E.D. Goldberg[16] 等の研究等がある。之れ等は何れも Plankton の算定に使用されたものである。之れに対し Plankton の Pigments Analysis に適用したものに G.I. Creitz 等[17] の研究がある。之れは Millipore-Filter (AA……Aerosol Assay type) が 90% Asetone に完全溶解する事を利用したものである。Plankton をも含めた所謂水中懸濁物の定量に使用した例としては，D.L. Fox[18] の報告がある。

一方ドイツ製は "Membran-Filter" として販売され，特性により 4 種に大別される。即ち (1) Membrane Filter 之れは水溶液用で乾燥保存が可能である (2) Ultra-Fine-Filter は水溶液用で湿潤保存を必要とする。以上に対し有機溶液用としては (3) Cela-Filter 及び (4) Ultra-Cela-Filter があり何れも湿潤保存のものである。尚之れ等は孔径により区分され，必要に応じ選択出来る。筆者等は専ら (1) の Membrane-Filter を使用している。

このものは乾燥保存に耐えるので極めて便利であるが，懸濁質の分析（例えば窒素量，有機燐等）には，Filter 自身の値が若干変動するので今の所使用していない。灰分は殆んど無視出来るので懸濁物の灼熱減量を求めるのには極めて便利である。Pigments Analysis にも大体使用出来る。亦水中懸濁物を直接検鏡するには屈折率 1.50 の液を浸すと Filter は透明になる。

従来から，現在でも，水中懸濁物の採集に使用されている濾過膜に "Gradocal membrane" がある。之れは各種の孔径をもつた一連の膠質膜で Elford が Virus の大いさを決定するために使用したと云う歴史的にも有名なものである。膜を通過し得る最大粒子径は孔径より若干小さく，両者の関係は経験的に求められている。[19]

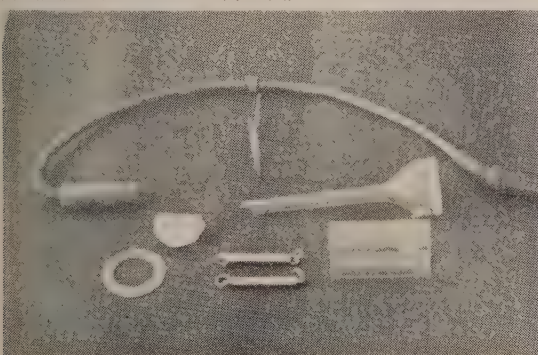
Gradocal membrane を海水に利用したものの若干をあげると，F.A. Armstrong & W.R.G. Atkins[10] は孔径 1.09，0.61，0.2 μのものを使用し，懸濁物の粒度組成を見た。0.2 μ を用いた場合でも完全には懸濁物を除去し得なかつたと云われている。D. Ballentine[20] は 0.5 μ のものを Nannoplankton の採集に使用している。

Powder Filter に依る濾過に就いては D.L. Fox 等[8] の研究がある。使用している漏斗は Stainless 製の直径 30mm（濾過面）で，純粋の MgO, SiO_2 の等量混合粉末を使用している。筆者等[9] も之の方法を若干変え（特に浅海用として）て使用している。

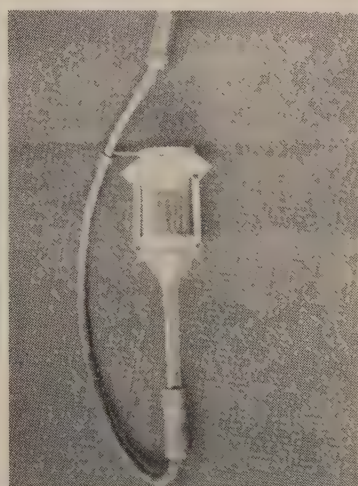
以上濾過材に就いて通観したが，之れ等濾過材は夫れ夫れの特長をもつており，使途に依り撰択すべきもので一概に甲乙はつけ難い。筆者は大体次の様に使い分けしている。即ち懸濁物を Plankton-Net XX—13 に依つて大型と小型にわけ，大型に就いては更に分轄せず，乾物量，灼熱減量，排水量等をはじめ，窒素分析等化学分析に供する際は，一括して東洋濾紙 No. 5A で再濾過する様にしている*。Plankton-Net XX—13 を通過するものに就いては，Glass-Filter, 東洋濾紙 No. 5A, "Membran-Filter" No. 2 (M.P.S.0.5 μ) で分轄し，夫々の濾液に就いて後述する光学的方法を利用して，粒子の相対的量を求める様にしている。勿論筆者の現状では小型を再分轄する必要のない場合が多いので "Membran-Filter" で得られる小型懸濁物(100 μ～0.5 μ)に就いて，各種の測定値を求めている場合が多い[21]。窒素分析等有機物量の推定には Powder Filter を使用しているが，海水中の Ammonia には充分注意する必要がある[9]。

さて，各種濾過材に就いては以上の如くであるが，調査に之れ等を使用する場合には尚多くの問題がある。紙数の関係で之れ等に就いては省略するが，測定器具に若干関係する問題として，懸濁物の変質がある。

変質中特に注意されているのは採水に依るもので，採水する事は極力避くべきであるとされ，水中で直接採集するための努力がはらわれている。D.L. Fox 等[5)16] は Powder-Filter, 或は "Millipore Filter" を海中で使用する際の器具として，所謂 "Scripps Subsurface Autofiltrator" なるものを考案している。之れは濾過器と受器よりなり，前者は陸上で使用するものと同一であるが，受器は真空で，所要の水深に垂下し，船上よりの操作に依り作動させ得る様になつている。筆者は浅海での調査に適する水中濾過装置を考案し，可成の成績を収めている。（第2図）



A



B

第2図　水中濾過装置（内水研型）　A……分解図　B……組立図

野外での直接調査にあたつては，濾過速度の問題は調査計画に直接関係するので使用する器具に就いては予め測定しておく必要がある。

現場での直接測定器具の考案は急務であるが，今の所，懸濁物の分轄濾過の域には達していない様で，之れは専ら陸上で行われている。

最近各方面で Ion—交換樹脂の活用が盛んになつているが，水中懸濁物に使用したという例には接しない。今後考慮さるべきものと考える。

* 遠心分離法の採用が良いとされているが[20]，小型舟艇に依る調査の多い浅海では遠心分離器の使用は極めて困難である。

以上は主として粒子の大いさを，求めようとする場合であり，懸濁物の大いさに依る分轄の方法である。勿論分轄された夫々の Fraction は何等かの方法に依り，その中に含有されている懸濁物の量を求めてこそ測定上の意味をもつものであり，多くの場合は，乾物量として求められている。乾燥温度は夫々の研究者に依り，且つ亦乾物のその後の使途に依り区々である。筆者は，乾物量及び灼熱減量を求める場合には 100°C で乾燥し，Pigments Analysis に使用するものは 30°C，3 mm（水銀柱）で減圧乾燥している。之れ等に就いては塩分が問題になる事は当然で，筆者は懸濁物を蒸溜水で洗浄しその限度を硝酸銀反応のなくなる所においている。之の方法は余り良いものとは考えられないが，小量の懸濁物に就いては余り問題をのこさない。D. Jones 等[22]は塩分補正をしている。之れ等に就いては後述する。

iii：沈降速度の利用

沈降速度の差異に依り粒子を分ける方法は極めて古い時代から行われていた様である。此処では重力に依る粒子の沈降速度の利用について述べ，遠心分離については次項にゆづる。

水中懸濁物に沈降速度を利用した例は今の所ない様である。之れは懸濁物の濃度が小さい事，採水に依る変化と同時に貯水中の変化が大きい事に原因がある様に考える。しかし海底直上の採水が簡単化されつゝある今日[23][24]之の方面での利用は有望であろう。唯海底の泥質調査には盛に使用されている。

その原理，方法の基本等は陸上の土質調査の場合と同一で，その面の成書[25]は多いので詳細はそれ等を参照されたい。尚，奥田等[26]も述べている如く海底土は多量の塩分を含有するために微細粒子は凝固して不正確となるので，充分塩ぬきを行う事が必要である。N. A. Holme[27] の方法は若干異なると同時に，之の方法で得られた値と *Ensis* の分布が可成良く一致する点で興味がある。方法の概要は Sample を一度乾燥し，良く破砕した後有機物及び凝集をなくすために過酸化水素と共に加熱する。0.124 mm 以下のものに就いて 10cm 間隔の2線をつけた Cylinder に入れ，上部線迄蒸溜水を入れ，良く攪拌した後，静置し，1分 56 秒（20°C）後 Syphon で上部懸濁液を下部線迄流出させる。之れを上部液が清澄になるまで繰返し，流出液を一諸にしたものに少量の明礬液と数滴の醋酸を加え1～2日後既知重量の濾紙で濾過し，良く洗い，乾燥した後秤量する。之の場合の粒子は 1 32 mm 以下である。本方法は奥田等のそれに比較し，粒子区分は大まかであるが，操作の点で簡単であり，多くの試料を処理する上に便利である。

以上は一般に水簸分析（Elulriation Analysis）と呼ばれるもので，懸濁物の粒子が大きい程速く沈降し，その比重は水のそれより大きい事が前提となる。亦之の分析は所謂 Stokes の法則がその基礎となつており之の法則が成立するための粒子径の範囲には限界があり，普通半径 0.1～0.2 μ とされている事に注意すべきであろう。

iv：遠心分離法

水中懸濁物に対する遠心分離法の適用は主として，懸濁物の濃縮にあり，直接懸濁粒子の大いさを求めるために使用した例は見ない。

遠心分離はいうまでもなく，本来的利用の場は，重力場では沈降しない様な懸濁物或は Colloid 粒子を媒質から分離するためのものである。最近高分子化学の面で分子量決定のために盛に利用され，理論的にも亦そのための分離機の改良にも急速の進歩をとげつつあり，懸濁物えの適用も近き将来の事であろう。尚理論その他に就いては成書も多いので省略した。[28]

従来水中懸濁物特に Plankton の濃縮に利用されて来た遠心分離器は手動式の極めて簡単なものから，せいぜい 4000 r.p.m. 程度のものであつた。実際には可成多くの試料を処理する必要がある。之のために丸茂[29]は普通化学実験室で使用している遠心分離器を若干改造し同時に 12 試料を処理出来る様にした。尚，遠心沈澱管の形状は充分吟味すべきであるとも言つている。

普通使用している遠心分離器による懸濁物の集収の程度は D. Ballentine[20] に依れば極めて良好であるとされている。即ち，Nannoplankton の採集方法の比較を遠心分離法，0.5 μ 孔径のCollodium Membrane 同孔径の M.F.，R.H. Millar 法及び培養法の5種について吟味した結果，実際的操作の上と精度とから遠心分離法が最も良いと結論している。この場合の廻転数は 1500 per 1min で 15 分継続。
一般に行われている Plankton 分離の廻転数は1分間 1,500～3,000 で，継続時間は大体 10～15 分の場合多い様である。

外国では可成高性能の機械を採用している。例えば D.C. Chandler[30] は Erie 湖で懸濁物を得るのに

20,000 r.p.m. を使用している。之のほか,Foerst Plankton Centrifuge の使用も盛んな様[17] であるが，筆者は未だ現物に接する機会を得ない。

b. 光学的方法

水中懸濁物の大いさ，或はその量を測定する方法は前項の力学的方法と同時に光学的方法が盛んに使用されて来た。之れはすでに述べた如く，懸濁物の変化し易い特性に対するものとして注目すべきであろう。亦懸濁物の大いさに就いては，空中塵埃，霧，煙等に関する測定理論等に刺戟された結果とも考えられる。

i) 顕微鏡に依る方法

Plankton の大いさ，或は密度等は従来専ら此の方法に依存して来た事は周知の如くである。しかし最近水中に存在する微細粒子は所謂 Plankton 以外のものが多く，Plankton-Net を通過する懸濁物の重要性は，直接的にも[10)29)31)32)33)34)] 生物の栄養源の点[5)35)36)37)] からも認められている。しかし Plankton 以外の粒子は極めて小さい場合，不定形な場合等があり，検鏡するには極めて不適である。

最近電子顕微鏡の進歩に依り，微小粒子に対する研究もようやく始められ[34)]て来たが，一般化される迄には色々の問題がある様である。

以上の様な事情にあつて W.R.G. Atkins, P.G. Jenkins & F.J. Warren[38)] 或は E.D. Goldberg 等[16)] の研究は今後大いに期待さるべきものではなかろうか。前者は Collodion Membrane で 1～2 l の海水を濾過し 80% Asetone で色素を抽出し，20 倍程度の低倍率双眼顕微鏡で検鏡する。之の際使用する光は強度の Reflected-light で，之の点が重要である。之の方法で泥とか粘土或は墨の微片亦は纖維等が区別し得る。更に偏光で見ると，その他,酸化鉄等の分離も行い得ると云われている。後者は M.F. で濾過したものの中の鉄を Potassium thiocyanate で飽和した "Tween 80" で処理し発色せしめ，検鏡して鉄粒子の粒度分布を求めるものである。

ii : 散乱光を利用する方法

散乱の強弱が溶液中の粒子の大いさと関係の深いことは古くから多くの人々に依り知られていたが，Lord Rayleigh (1871) は光の散乱の電磁気学的理論を確立し，その後の発展の基礎を作つた。しかし溶液中の粒子の大いさが，光の波長の大体 1/20 程度より大きくなると粒子の各部からの散乱光が互に干渉しあつて，強度が減少し Rayleigh の法則が成立しなくなる。

吾々が研究対象として考えている水中懸濁物は主として大型粒子（光の波長程度が最小）であるため，Rayleigh の法則は殆ど適用出来ないものと考えてよいであろう。此の様な大きさの粒子に依る散乱に就いては，一般解は今の所得られていない様である。唯，溶質と溶媒の屈折率の小さい場合とか，特に球状粒子の場合については Mie に依つて解が与えられている。以上を換言すれば，Rayleigh の式が成立するのは $2\pi R/\lambda \ll 1$ で $2\pi R/\lambda \gg 1$ の場合は幾何光学的球面での反射現象が予想される。$2\pi R/\lambda \approx 1$ が吾々の取り扱う場合の様に考えられるが，之の附近では極めて複雑で強い Depolarization を示すと同時に散乱光の強さも粒子が大きくなると，波長の 4 乗に逆比例すると云う単純なものでなく，λ^{-3}, λ^{-2}, λ^{-1} 等に比例するといわれている。$2\pi R/\lambda \approx 1$ に就いての散乱現象解明は光学に於いての研究課題であると同時に水中懸濁物に就いても，その専門家の出現が待たれる次第である。最近 Colloid 化学，高分子化学での研究が目ざましく，之の面での成書も多くなつて来ている。

水中懸濁物の粒子の大いさを Mie の法則を採用して研究したものに W.V. Burt の業績がある[39)40)]。即ち Beckman Spectrophotometer の長吸収管を使用し，懸濁物 (Chesapeake Bay のもの) の水中での相対屈折率を 1.15として各種の条件を入れて,種々の粒子径(0.1～1.6 μ)について,波長―f(k) (k は Effective Area Coefficient) の理論曲線を作り，測定値を対比させる事に依り，水中懸濁物の大いさを推定している。筆者等も日立製 Spectrophotometer を用い（吸収管の長さ 10cm）て研究しており若干の人工懸濁物に就いては成功したが[41)]，海水中の懸濁物に就いては未だ報告する迄には至つていない。Jerlov & Kullenberg は均齐な Minerogenic Suspension について，Tyndall 効果を測定し，粒子の大いさを測定しているが，未だ原報告に接する機会を得ない。

尚，D. Jones & M.S. Wills[22)] は A.R.L. 型水中濁度計（後述）を使用し粒子径を求め様としているが，今後の問題であろう。

iii：透明度板の利用

或る物体が水中に沈下して行く場合，或る水深に達すると見えなくなる。之の様な現象を利用して水塊の特性を把握しようとするのが透明度の測定である。

水の内部よりの照度を Mo，透明度板上の水柱よりの照度を Mo'，深さ z に下した白円板の為に加つた照度を Dz とすれば

$$\frac{(Mo'+Dz)-Mo}{Mo}=\triangle$$

△＝1になつた時の深さZが透明度となると云われている。[42]

透明度の理論は必ずしも確立されているとは考えられない。此処では理論に深く立ち入ろうとするものではなく，実際問題として，透明度と水中懸濁物との関係を求めた研究に就いてその若干を見ようとするものである。吉村[42]は有機物の多い湖の資料にもとづき両者の関係を求め大体雙曲線で表される事を報告し，丸茂[43]は日本近海につき透明度と，Net—採集による Plankton 量との関係は逆比例的関係にある事を見，相川[44]の結果を更にうらづけている。

何れにしても両者の関係は概略的であり，透明度を知る事に依り，水中懸濁物の量を求める段階には到つていない。

此れ等は何れも水中懸濁物の測定が Net-Plankton 量であり，それより多い Micro-suspended-mater を無視した事も1つの理由であろう。

花岡[55]は Net-Plankton（排水量）が m cc./m^3 ある場合と同等の透明度に影響する微細懸濁物を想定して色々論議を展開し，後述の如き懸濁質係数（Suspension-Factor）に達した。

透明度測定は簡単であると云う一面だけでも捨て難い長所があると同時に，最近水中照度との関連で色々考察され，新知見を産みつゝある。前述の顕微鏡の場合でも同様であるが，海での調査と云う事を念頭におき，そこで使用し得る器械を充分駆使する事は，充分意味のある事ではなかろうか。陸上で便利な器械が海の研究にそのまゝ使用し得るとは考えられない。

iv：水中照度の利用

水面に於ける波長 λ の光の強さを I_0，消散係数を α，深さ D に於ける光の強さを I_D とすると，次式が成立する。

$$I_D=I_0\epsilon^{-\alpha\cdot D}$$

尚，消散係数 α は次の3つの部分からなつていると考えられるであろう。

$$\alpha=\frac{K}{\lambda^4}+f(\lambda)+\gamma$$

第1項 $\frac{K}{\lambda^4}$ は水分子の散乱によるもので，K は比例常数，第2項 $f(\lambda)$ は水の撰択吸収で一般に第1項を遙に凌駕するとされている。亦第3項 γ は水中の懸濁物の吸収，反射，散乱に依るものである。

消散係数の大小により，水塊区分乃至はそこに存在する懸濁物量を求めようとした研究は極めて多い。之れ等に就いてはすでに本誌に於いて綜説されている[45]。

現在盛んに使用されている水中照度計は Selenium 堰層光電池（普通光電池と略称されている）である。水中照度計はその型式から大体2つにわけられる。その1つは単一型で，他は所謂補償型（複式）水中照度計である。[46]

理論的には後者の補償型が優つているが実際上では何れも一長一短がある様に考えられる。

単一型の致命的難点は入射光の強さが一連の測定時中に相異した場合，修正出来ない所にある。複式型は之の欠点を除去する事が出来るが，常に揺れている小舟艇の場合，水中部光電池と所謂 Deck cell との電流を零とする事は極めて困難である。筆者等は両者を使用したが，現在では単一型で静穏な日の日中を選んで調査している。尚，使用する電流計は出来るかぎり内部抵抗の少ないものを撰択すべきである[12]。亦太陽の位置に依つて照射される光の波長組成は一定でなく，それより来る誤差を防ぐためには，測定を正午近くに行うべきであろう[47]。水中部の構造も陰を作らぬ様に工夫する事が必要である。石崎[48]の研究で明らかな如く，受光面を入射光に直角に保つ事が望ましいが，水中では之の様な操作は極めて困難であるので，少くと

も受光面を水平に保持すべきである。何分光電池は湿度に弱い[49]ので之の点は注意が必要である。Filter は現在殆どの場合使用しているが，研究者に依つて夫々異なつている。従つて資料比較のためにも使用 Filter の特性は明記する事が望しい。尚，水中で Filter の交換が出来る様に工夫されたものもある[50]。亦光電管を使用して水中に於ける光の角度分布を測定する特種な水中照度計も考案されている[51]。

水中照度の測定は比較的簡単であり今後各方面での利用が考えられるが，何れにしても照度計の特性を明記する事が望しい。

v ： 濁度の利用及び測定

水中懸濁物の質，量を光の吸収の点で測定しようとする場合，主として濁度計を使用する。

濁度の定義には可成混乱が見られ，菱田[12] は Lambert の式 $\varepsilon d=\log_e I_0/I$ （こゝに I_0, I は夫々入射光と透過光の強さ，d は液層の厚さ，ε は光の減衰を示す）に於いて，消散係数と区別するために，人工平行光線を使用した場合の ε を濁度としている。衛生試験法[52] にはそれなりの定義が与えられている。即ち飲料水の濁度とはカオリン 1 mg を蒸溜水 1 l 中に含む場合を濁り 1°（又は 1 ppm）として相対度数で示す。管原等[53] は濁りの程度を示すために，減光係数（$\lambda_s-\lambda_0$）を与えている。λ_0 は蒸溜水の吸収係数，λ_s は試水のそれである。気象学方面では独自の定義がある様である[54]。筆者等は波長 λ の平行光線を用い，Light-path 30cm の水層に於ける蒸溜水の透過率を I, 試水のそれを I_s とした場合，$\varepsilon=\dfrac{2.3}{0.3}(\log I-\log I_s)$ で濁度を定義づけている[55]。

海水の濁度測定器は大きく 2 つに分けられる。即ち陸上型と水中型のそれである。陸上型は一般の比濁計乃至は比色計等の使用が考えられるが，この場合には試水が可成混濁している必要がある。中村[56]は養鰻池のアオコの濃度測定に 2 cm 吸収管を使用している。亦深井等[57] の如く培養実験に於ける植物 plankton の濃度測定等では，普通実験室で使用している 10 mm 吸収管でも充分であろう。しかし海水の測定には吸収管の長いものが要求される。W. V. Burt[58] は Beckman Spectophotometer を改造し，50 cm, 10 cm の吸収管を使用している。筆者は日立製 Spectrophotometer で 10 cm の吸収管[59] を使用しているが西部日本沿岸の試水であれば可成の精度で濁度測定が可能である。

多くの場合は市販品でなく，各研究者が，それぞれの目的に応じて試作している。若干の例を挙げると，R. T. Young[60] の濁度計は，直径 1.2cm の平行光束を直径 2.5cm 長さ 1m の硝子管を通過させるもので，光は直径 0.8cm の Slit を通り，R. C. A. 917 Vaccum phtotube に達する。光源は 108W, 6V Tungsten Filament 電球を使用し，Filter は 5400Å に最大透過率をもつ "Sextant Green Filter" である。

管原等[53] は一種の補償回路型濁度計を使用している。本器の Light Path は 40cm, 使用電球は 6V, 試水量は 250〜300cc である。

C. H. Roberts[51] は栄養塩の定量用として濁度計を作つている。本器の特長は集光のために Mangin type の鏡を使用している点にある。電源は 70A・h, 12V の蓄電池で，Light Path の長さは 250 mm, 試水容量は 60cc。

筆者等[55]は顕微鏡用投光器を若干改良した簡易濁度計（第 3 図）を使用している。特に精密な測定を必要としない場合は結構便利である。本器は菱田の濁度計[12]を参照して作つたものである。光源は 6V, 6A の光電比色計用の Tungsten Filament 電球を使用，電源は蓄電池で，Filter は東芝製 V－YID を使い Light path は 30 cm 試水量は 300cc.。

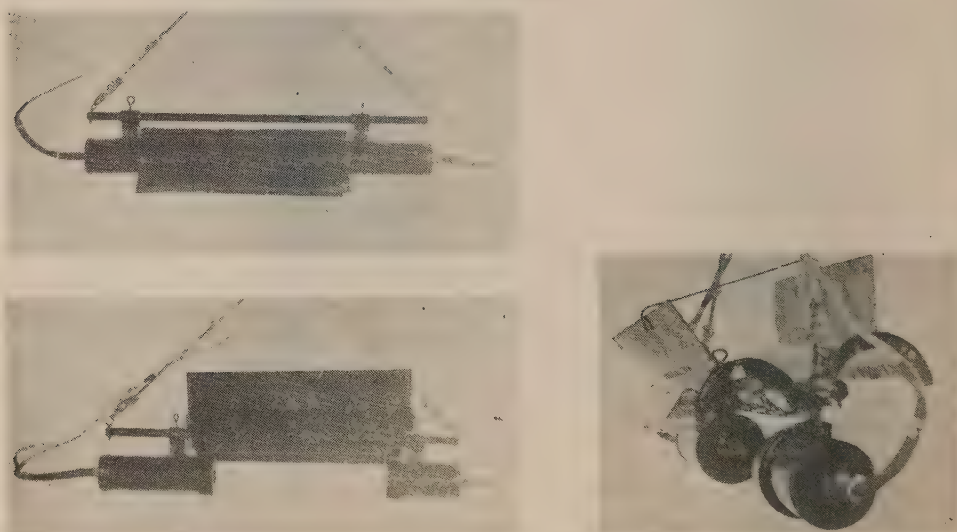
以上が陸上型濁度計であるが，その長所としては，安定した条件で測定が出来る事であろう。しかし，すでに述べた如く，水中懸濁物は可成複雑な組成であると同時に極めて変化に富むものであつて，採水や静置に依つても極めて大きな変化を示す。従つて，測定精度は期待し得るとしても，その値がどの程度，現場の海水事情を示すかには多くの疑問が残る。尚，実際の調査に於いて，詳細な調査を実施する場合には，可成多くの採水瓶を必要とする。之れも不利な点と言うべきであろう。濁度計と云う事が出来るか否かは別として新田[62]は透視度計を考案し，工場廃水の濁濁度を求めている。

さて，さて以上の諸欠点を除去しようとして考案されたのが，所謂水中濁度計である。しかし実際的には色々の面倒な事が起つて水中照度計程簡単なものではない。

現在使用されているものには 2 型ある。その 1 つは所謂開放型とも言うべきもので，測定は最も自然のま



第 3 図　陸上用簡易濁度計（内水研型）



第 4 図　完全閉鎖型水中濁度計

A……閉鎖時の状態 ： 測定は此の時行う

B，C……は開放時の状態 ： 水中垂下中は此の様になつて降下する。

ゝで行われ，理想的である。之の場合外部（人工平行光線以外）光の問題を考慮しなければならない。佐々木等は[63]一つの水中濁度計を試作した。本器は光源部，受光部及び計測部の 3 つから成り光源部，受光部が連結されて水中部となつている。外部光に対する構造上の考慮は余り見られなく，測定時，点燈時の値と消燈時の測定値とを求め，補正する様にしている。之の点のみでは可成原始的の観がある。福田等[64]の水中濁度計は外部光の分離を計つている点では更に進んだものと言えよう。測定原理は廻転 Sector などを使用して光源からの光を断続して光電管に入射させると交流型式とすることが出来るので，更に之れを交流増巾して，外部光と人工交流型式のそれとを分離する事に依つている。断続光を得るためには色々の方法があるが，本器は廻転 Sector を使用している。A.R.L. Hydrophotnmeter (Admiralty Research Laboratory Hydrophotometer)[22] も開放型の一つである。本器は補償型式をとつている。光源部は他の濁度計と異なる所はないが受光部に集光 lens があり，之の焦点に Slit があり，外部からの光を可及的に遮断する様に工夫されている。筆者等も現在之の式の濁度計を組立て中である。以上の開放型に対して閉鎖型の濁度計がある。之の型式は更に完全閉鎖型と不完全閉鎖型とにわかれる。完全閉鎖型は余り見られないが筆者等は第 4 図の如く，蝶番によつて開閉する液層部をもつ水中濁度計を使用している。各所に不備な点はあるが，高度の精度の精度を要求しない場合には充分使用に耐えるものである。之れに対して下完全閉鎖型に属するものの例は多く，

時には Transparency-meter ともいわれている。有名な器械は H. PETTERSSON[65] の濁度計で，之れはその後 N.G. JERLOV[66] によつて若干改良されている。之れは前述佐々木等の濁度計に類似したもので，光源部と受光部とが同一の箱におさめられ，光は一定距離にある鏡に依り反射される様になつている。従つて Light-path は器械の割に長い。亦受光部には Flange があつて他からの光を遮断する様になつているが，充分でなく，点灯時の値を消灯時の値に依つて補正する必要がある。

さて，水中濁度計の問題点の若干をあげて見よう。その第1は，受光部，光源部の窓のよごれである。筆者等の如く浅海の懸濁物の多い水域での調査の場合には特に此の問題は大きい。今の所自動的によごれを除去するものはない様である。吾々は船上に於いてきれいにする事に務めているに過ぎない。第2の点は電球の疲労に対する事で，充分注意しないと，折角の測定値も使用出来ない場合が起り，予備品は充分にする事が望しい。第3は対象を何に求めるかの問題である。蒸溜水にする事は望しいが，器械全体を蒸溜水に入れるか，Light-path にあつた管を挿入しそれに蒸溜水を入れ，あたかも陸上用の場合と同様にする事も出来るが，前者は多量の蒸溜水を必要とする欠点があり，吾々は後者に依つている。しかし前述の如く，常に対象測定を必要とする（よごれに依り）ので之れは実際には大変である。空気中の値を使用する事も考えられるが菱田は余り感心した方法ではないと言つている。之れはよほど注意しないと，空気中の湿気や硝子の "ぬれ" に禍される事がある。

濁度計に依つて得られる値は所謂光の透過率であつて濁度は消散係数とその内容を異にする事は当然である。筆者は今の所懸濁物の濃度を求めるために主として濁度を測定している。

vi：懸濁質係数

筆者等[41]は水中懸濁物の相対的大いさを水中照度と透明度より概略推定する方法を導いた。これは花岡・村上[67]が先に求めた "a" の内容を更に発展して得られたものである。

色々の海水について表面と透明度の深さに於ける照度を測定し，縦軸に透明度の位置の照度の表面照度に対する百分率をとり，横軸に透明度（m）をとる。そうすると同一水塊では $IT=I_0 exp(-aT^b)$ なる関係が経験的にあてはまる。但し I_0 は表面照度(100 としている)，IT は透明度深の照度(表面照度に対する%)，T は透明度の深さ（m）a，b は常数で特に b は今の所 0.7 としている。a を懸濁質係数と定義している。

a は粒子が同一であればその濃度には関係しない。亦 a が大きい程，粒子は小さい。更に浅海において，透明度が測定出来ない場合とか，水塊の立体構造を知ろうとする場合には，消散係数と濁度より a を求める事も出来る。

以上数項にわたり懸濁物の大いさ及び量の測定法に就いて概説したが，内容は懸濁物の採集法に終始したかの感がある。今後大方の御指導を得て，より完全なものとしたい。

懸濁物の分轄は前述した方法に依つて実施出来るが，各分轄懸濁物の量の測定に就いては充分説明をしなかつた。以下その概略に就いて触れてみよう。

分轄懸濁物は勿論，懸濁物全体に就いての質的量的測定は主として化学的手法に依る場合が多いが，そのための懸濁物の化学が存在しているわけではなく，化学的知識全般の導入が必要であろう。

3. 懸濁物の分析法

i：乾物量の測定

採集した懸濁物の量的標示は多くの場合乾物量として行われている。乾物量の測定法は，その後の使途に依り異なつている事は一般化学分析に於けると同様である。

D. JONES & M.S. WILLS[22] は次の様にしている。即ち使用する Membrane Filter を 50°C で，磁器皿上で恒量（a）とする。濾過後，Membrane の Wet Weight を求め（b），次に磁器皿上で乾燥（50°C）秤量（c）する。50°C で処理した理由は Membrane の Pore size の変化を防ぐためであり，亦 Wet Weight を求めたのは塩分補正をするためである。D.S. RAWSON[68] は 60°C の oven 中で 48 時間，亦は恒量になる迄乾燥している。乾物量を求めた後に，その試料を Pigments Analysis に使用する場合には特別の注意が必要で，可及的低温で行う事が望しい。F.A. RICHARDS 等[69] は遠心分離した懸濁物を分離管と供に Vacuum desiccator 中で乾燥している。筆者等は "Membran Filter" を使用して得た懸濁物を 30°C の Vacunm desiccator 中で乾燥し，秤量して乾物量を求めるか，或は 30°C，3 mm（水銀柱）の減圧乾燥をしてい

る。尚，吾々の経験では之の様にして得た乾燥物は 105°C に乾燥しても殆んど変化がない。

ii ：有機懸濁物の測定

若干の疑問があるにしても水中有機懸濁物の測定に，所謂，過マンガン酸加里消費量が使用されている。その一例として P. Korringa[70] の研究がある。本方法は Schulze-Trommsdorff の方法を高塩分海水に適する様に改良したものである。過マンガン酸加里消費量に就いては海洋観測に普通使用されているので省略する。

有機懸濁物の推定に所謂灼熱減量を使用する場合がある。D. Jones 等[22] は乾物量を測定したものについて灼熱減量を求めている。之の場合の坩堝は白金製で加熱温度は 550°C，その時間は 30 分である。筆者も之れに準じて測定しているが，何分海水中の懸濁物は極めて少なく，1 l 中吾々が調査している浅海でも数 mg で，時には 1mg 以下の場合もある。その上 "Membran Filter" で濾過する場合には可成の濾過時間を必要とするので，多くの懸濁物を得る事は困難である。従つて天秤は微量天秤を使用している。

D.L. Fox 等[8] は所謂 Powder-Filter で得た懸濁物に就いて Kjeldah 法に依り窒素を，亦有機炭素量は Waksman S.A. の方法に依つて求めている。筆者等[9] も有機窒素を Kjeldahl 法で求めたが，之の場合海水中の NH_3 には注意すべきであろう。有機物中の窒素を測定するために行われた H.W. Harvey[71] の微量分析法は水蒸気蒸溜を行わない点と，極めて少量の海水で間にあう点で貴重なものであろう。

窒素，炭素測定以外に有機燐から懸濁物を確認しようとする試みも多い。燐の測定が比較的微量な所迄行い得る事が，之れを使用する理由の一つであろう。有機燐の測定法に就いては多くの研究者に依つて吟味されている。

此処にはその内の 2，3 に就いて紹介するに止める。町田[72] は R.J. Robinson 法，R.J. Robinson-G. Kemmerer 法，L.H.N. Cooper 法，A.C. Redfield 法に就いて精度の比較を行つている。F.A.J. Armstrong[73] は測定中に入り込む各種 Error の原因を研究し，Deniges method で Absorptiometer を使用する場合，Stannous chloride 試薬が低濃度の HCl であり，Stannic tin を含む時は Error の原因となる事を述べている。A.L. Hansen 等[74] は過塩素酸法を推薦している。筆者は現在之の方法を使用している。

水中の糖類がカキの生理に可成関係がある事が明にされ[75]，水中の糖類の研究もようやく盛んになりつゝあり，今後懸濁物との関連でも興味ある事であろう[76][77][78]。

iii ; Pigments Analyses

懸濁物中の生・無生の区分，或は Phytoplankten Population の研究に所謂 Pigments Analyses が使用されている。生産の基礎をなす Phytoplankton の Chlorophyll に着目したのは E. Kreps 等[79] が初めではなかろうか。その後器械類の進歩と相まつて，急速な進展が見られた。Pigments Analyses は大体 3 つの方向で考えると便利であろう。その 1 は Pigments に関する研究であり，その 2 は所謂 Plankton Equivalents の問題であり，その 3 は Phytoplankton Population に関する研究である。

第 3 の点は今の所直接関係がないので前二者に就いて若干考察した。Pigments 自体の研究は極めて多く，単に懸濁物のみの問題ではない。N.J. Pace[80] は *Nitzshia closterium* の中に含まれている chlorophyll a b ; β-carotene ; cryptoxanthin, lutein, isolutein を含む少なくとも 5 種の xanthophylls を chromatographic に分離し，その含有量並びに特性に就いて研究した。H.H. Strain 等[81] は Diatoms 又は褐藻中に含まれている，Chlorophyll a, chlorofucine, 及び Chlorophyll 類似の Green Pigment の研究を行つた。更に H.H. Strain 等[82] は Diatoms, Dinoflagellate 中の Chlorophyll c に就いて研究を行つた。その後 F.A. Richards 等[17],[69],[83],[85] は詳細な研究を行つた。

以上の様な Pigments の研究が進むと同時に，それ等を利用し，Plankton 量の推定を行う研究も盛んになり，所謂 Plankton Equivalents の問題が考えられて来た。Plankton Equivalents の一括表は一応与えられている[84]。しかし之の問題は極めて複雑な内容をもち，一概に云々し得ない様に考えられる。H.W. Harvey[56] は一つの Unit を提称した。之の "Unit of Pigment" と Plankton 個体数の関係は 1 Unit = *Rhizosolenia alata* 6950～7300 1 cc，亦は *Biddulphia regia* 224/1 cc であると言れている。Riley[87] に依れば Plankton 有機乾物量の 2.91% が Chlorophyll であるとされている。N.J. Pace[80] は *Nitzschia closterium* 乾物中の 2.32 % が Chlorophyll a, b であるとしている。又 H.H. Strain[88] に依れば *Chlorella*

中の Chlorophyll 量は棲息環境に依り異なり，特に光の多い時は全乾物量の 0.03%，少ない時は 6% にも達する事を報告している。W.R.G. ATKINS 等[89]，P.G. JENKINS[90] は G.R. RILEY の結果が妥当であるとしている。以上の如く Plankton-Equivalents の問題は今の所各研究者間でも一致していない。之の事は研究が少ない事にもよるが，懸濁物の複雑さを示すとも考えられる。

iv：懸濁物の Amino—酸

E.M. Low[91] は5種の Diatoms から 19 の Amino-酸を検出している。使用した Diatoms は純粋培養したもので，乾物量で夫々 27gr 以上である。分析方法は 6N—HCl 24 時間加水分解し，減圧下で濃縮，酸を追出す。残渣を一定量に稀釈後，Paper chromatography で Amino-酸を分け，夫々単離されたものについて，Rf を測定した。

之の様な詳細な研究が，直接吾々水産に重要な意義をもつか否かは別として，懸濁物の研究の一つとして紹介した次第である。

水中懸濁物の研究は多方面より行われており，その測定法も以上のほかに，音探測定，B_{12} の問題等がある。之れ等はすべて略した。亦本綜説も紙数の関係と，筆者の未熟から，文献を例挙したのみの感があり誠に粗末なものとなつた。幸大方の御理解のもとに，懸濁物の研究が盛になる資ともなれば筆者望外の幸である。

文　献

1) P. KORRINGA : The Quarterly Review of Biology, Vol. 27, No. 4, 1952.
2) C.B. JØRGENSEN : Biol. Reviews. Vol. 30, No. 4, 1955.
3) D.L. FOX : Bull. Scripps Institution, Technical Series. Vol. 4, No. 1, 1936.
4) B. JØRGENSEN : Biol. Bull. Vol. 103, No. 3, 1952.
5) 花岡資 : 内水研報告 No. 8, 1955. pp. 22
6) 古川・久岡 : 内水研報告 No. 10, 1957.
7) 水渡英二 : 科学 Vol. 24, No. 9, 1954.
8) D. L. FOX, J.D. ISAACS & E.F. CORCORAN : Jour. Mar. Res. Vol. 11, No. 1, 1952.
9) 古川・小笠原・久岡・野上 : 本誌. Vol. 22, No. 4, 1956.
10) F.A. ARMSTRONG & W.R.G. ATKINS : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 33. No. 1, 1954.
11) 岡本・古川 :（口頭発表）昭和 31 年度日本水産学会秋季大会. 昭和 31 年 10 月
12) 菱田耕造 : 日本海洋学会誌. Vol. 9, No 3〜4. 1954.
13) 古川厚 :（口頭発表）昭和 31 年8月，日本水産学会中四国支部例会
14) Y. MATIDA : 本誌 Vol. 19, No. 4, 1953.
15) 里見至弘 : 昭和 30 年度日本水産学会年会講演
16) E. D. GOLDBERG, M. BAKER & D. L. FOX: Jour. Mar. Res. Vol. 11, No. 2, 1952.
17) G.I. CREITZ & F.A. RICHARDS : Jour. Mar. Res. Vol. 14, No. 3, 1955.
18) D.L. FOX, C.H. OPPENHEIMER & J.S. KITTREDGE : Jour. Mar. Res. Vol. 12, No. 2, 1953
19) 水島・赤堀 : 蛋白質化学（2）昭和 29 年8月1日発行
20) D. BALLENTINE : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 32, No. 1, 1953.
21) 久岡・古川 : 昭和 31 年度日本水産学会秋季大会講演
22) D. JONES & M.S. WILLS : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 35. No. 2, 1956.
23) 大家正太郎 : 水産増殖. Vol. 3, No. 3, 1956.
24) J. BROUARDEL et L. FAGE : Papers in Marine Biology & Oceanography, Suppl. to Vol. 3, of Deep-Sea Research, 40—44, 1955.
25) 最上武雄 : 土質力学，1951，岩波書店（之の他多数あり）
26) 奥田・佐藤 : 東北水研報告 No. 4. 1955
27) N.A. HOLME : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 33. pp 145〜172, 1954.
28) 日本化学会編 : 実験化学講座 高分子化学・1956，丸善
29) 丸茂隆三 : 日本プランクトン研究連絡会報，Vol. 2, No. 1, 1954.

30) D.C. Chandler : Ecology. Vol. 23, No. 1, 1942.
31) 古川厚 : 昭和 31 年度日本水産学会秋季大会，浅海増殖に関するシンポジウム講演要旨. 1956.
32) 久岡・古川 : 昭和 31 年度日本水産学会秋季大会発表. 1956.
33) W.H. Harvey : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 29, No. 1, 1950.
34) 辻田時美 : 西海区水研究報告. No. 10. 1956.
35) 花岡資 : 内水研報告, No. 1, 1952.
36) W.R. Coe : Jour. Mar. Res. Vol. 7. No. 3, 1948.
37) C.E. Zobell, C.B. Feltham : Ecology Vol. 23, No. 1. 1942.
38) W.R.G. Atkins, P.G. Jenkins & F.J. Warren : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol 33. pp. 497～509, 1954.
39) W.V. Burt : Jour. Mar. Res. Vol. 4, No. 1, 1955 a.
40) 〃 1955 b.
41) 花岡・古川・野上 : 本誌 Vol. 22, No. 4, 1956.
42) 吉村信吉 : 湖沼学, 昭 17 年, 三省堂.
43) 丸茂隆三 : 日本海洋学会誌, Vol. 7, No. 1, 1951.
44) 相川広秋 : 海洋浮游生物学
45) 竹内能忠 : 本誌 Vol. 8, No. 4, 1939.
46) M.H.W. Gall : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 28, No. 3, 1949.
47) W.R.G. Atkins : Jour. du Conseil. Vol.7, No. 2, 1932.
48) 石崎秀雄 : 東芝レビュー, Vol. 8, 418, 1953.
49) 武藤義一 : 比色分析法, 共立出版, 昭和 32 年.
50) 佐々木・岡見・渡部・大柴 : 科研報告. 第 31 輯 1号, 1956 a.
51) T. Sasaki, N. Okami, S. Watanabe, & G. Oshiba : Jour. Scientific Res. Institute Vol. 49, 1955.
52) 衛生試験法 : 13 版, 昭 30 年, 南山堂
53) 菅原・小穴等 : 水産研究会報 No. 2, 1949,
54) 理化学辞典 : 岩波書店 1953.
55) 野上・古川 : 昭和 31 年度日本水産学会秋季大会
56) 中村中六 : アオコの濃さと水中の明るさ, 鰻のシンポジウム 1955.
57) 深井・大久保 : 水産増殖. Vol. 1, No. 3, 4, 1954.
58) W.V. Burt : Science, 118, 386～387, 1953.
59) 日立製作所 : C—2 型長吸収管附属装置及び取扱説明書
60) R.T. Young : Jour. Mar. Res. Vol. 4, No. 2, 1943.
61) C.H. Roberts : Jour. du. Conseil. Vol. 17, No. 1, 1950.
62) 新田忠雄 : 内水研報告, No. 10, 1957.
63) 佐々木・大柴・渡辺・岡見 : 科研報告, 第 31 輯, 1号, 1956 b.
64) 福田・井上・西沢 : 北大水産研究彙報 Vol. 5, No. 1, 1954.
65) H. Pettersson : Jour. du Conseil. Vol. 10, No. 1, 1935.
66) N.G. Jerlov : Reports of the Swedish Deep-sea Expedition Vol. Ⅲ. No. 1, 1951.
67) 花岡・村上 : 内水研報告 No. 6, 1954.
68) D.S. Rawson : J. Fisheries Reserch Board, Canada. Vol. 10, No. 5, 1953.
69) F.A. Richards with Thompson : Jour. Mar. Res. Vol. 11, No. 2, 1952.
70) P. Korringa : Department of Commerce and Industries. Division of Fisheries. No. 20, 1956
71) H.W. Harvey : Analyst. 76. 1952.
72) Y. Matida : 本誌 Vol. 18, No. 4, 1952.

73) F. A. J. Armstrong : J. Mar. biol. Ass, U.K. Vol. 28 No. 3, 1949.
74) A.L. Hansen & R.J. Robinson : Jour. Mar. Res. Vol. 12, No. 1, 1953.
75) A. Collier, S.M. Ray, A. W. Magnitzky & J.O. Bell : Fishery Bull. 84, Vol. 54. 1953.
76) P.J. Wangersky : Science 115, 658, 1952.
77) G.J. Lewis & N.W. Rakestraw : Jour. Mar. Res. Vol. 14, No. 3, 1955.
78) J.R. Vallentyne & R.G.S. Bidwell : Ecology, Vol. 37, No. 3, 1956.
79) E. Kreps & N. Verjbinskaya : Jour. du. Conseil, Vol. 5, 326. 1930.
80) N. J. Pace : J. Biol. Chem. 140 : 483—489. 1941.
81) H.H. Strain & W.M. Manning : J. Biol. Chem. 144 : 625—636. 1942.
82) H.H. Strain, W.M. Manning & G. Hasdin : J. Biol. Chem. 148: 655—668. 1943.
83) F.A. Richards : Jour. Mar. Res. Vol. 11, No. 2. 1952.
84) H.U. Sverdrup, M.W. Johnson & R.H. Fleming : The oceans their physics, chemistry, and general biology. 1952, p. 929
85) A.C. Duxbury & C.S. Yentsch : Jour. Mar. Res. Vol. 15, No. 1, 1956.
86) H.W. Harvey : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 19, 761—773, 1933—1934.
87) G.A. Riley : Bull. Bingham Oceanogr. Coll. 7, (3), 1941.
88) H.H. Strain : Manual of Phycology, ch. 13, Waltham. Mass., U.S.A. 1951. (間接)
89) W.R.G. Atkins & P.G. Jenkins : J. Mar. biol. Ass. U.K. Vol. 31, 1953.
90) P.G. Jenkins : Papers in Marine Biology and Oceanography, Suppl. to Vol. 3 Deep-sea Research 1955.
91) E.M. Low : Jour. Mar. Res. Vol. 14, No. 2, 1955.

雑　　録

○5月理事会

1. 開催日　　昭和 32 年6月3日
2. 場　所　　東京水産大学会議室
3. 出席者　　会長，理事 16 名
4. 議　事
   （1） 入会希望者承認　　個人 9，団体 1
   （2） 関西に設置される大学研究用原子炉に関するアンケートの要旨を Vol. 23, No. 1 の会告にのせ広く会員の希望を調べることゝした。

○中国，四国支部例会

32 年 5 月 25 日広島大学水畜産学部（広島県深安町津之下）

1. 魚類に対する麻酔剤の作用　松本文夫・°佐藤美和・河野哲哉・保田昌宏（広大水産）
2. 煉製品に於ける硼酸の防腐性について　畠中浩二・°浅川末三（広大水産）
3. 海藻の揮発成分に関する化学的研究 xiv 報　コンブの揮発成分について　片山輝久（広大水産）
4. 鯨油の窒素吸収について　石川安太郎（広大水産）
5. 河口域の濁度に就て．試作濁度計と予備的観測　野上和彦・°古川　厚（内水研）
6. 山口県豊田湖に於ける陸封アユについて　藤本政男（水講）
7. オオシロピンノ（Pinnotheres sinensis Shen）の寄生によるアサリの生長阻害の一例　°小山治行（広大水産）・勝谷邦夫・大島泰雄（東大水産）
8. 幸之浦養殖場に於けるアコヤガイ生殖巣の夏期変化に就いて　川崎義高（幸之浦真珠 K. K.）・°村地四郎（広大水産）
9. 藻類の生育に対する水流の意義についての一考察　松本文夫・°佐藤孜郎（広大水産）

昭和三十二年六月二十日　印　刷
昭和三十二年六月二十五日　発　行

第二十三巻　第二号

本号定価 130円
（送料別）

編集兼発行者　松　江　吉　行
東京都港区芝海岸通り6丁目　東京水産大学内
発　行　所　日　本　水　産　学　会
東京都港区芝海岸通り6丁目　東京水産大学内
振　替　口　座　東　京　59529番

印　刷　者　篠　原　収　二
印　刷　所　東海出版印刷株式会社
発　売　所　東海出版印刷株式会社
東京都中野区江古田 3 の1223
電　話　中　野（38）4101・9108

